

VALFREDO SHLEMPER

**MECANISMOS TRANSDUCIONAIS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS
FUNCIONAIS PARA A BRADICININA E PROSTAGLANDINA E₂
NA TRAQUÉIA DE COBAIA *in vitro***

**Florianópolis - SC
2005**

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia

**MECANISMOS TRANSDUCIONAIS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS FUNCIONAIS
PARA A BRADICININA E PROSTAGLANDINA E₂ NA TRAQUÉIA DE
COBAIA *in vitro***

Valfredo Schlemper

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

AGRADECIMENTOS

♦ À minha esposa Susana e aos meus filhos Lucas e Pedro, por terem aturado minha ausência durante tanto tempo e, apesar disso foram sempre meus incentivadores. Também ao meu novo filho Gabriel, uma grata surpresa durante o Doutorado.

♦ Aos meus pais, porque me colocaram no mundo.

♦ Ao professor Calixto, gigante da farmacologia, imortal e emérito, que para mim, além de ídolo e amigo, foi um espelho para minha continuação nos caminhos da ciência.

♦ Aos professores do programa da pós-graduação Giles, Jamil, Reinaldo, Pádua, Thereza, Gina, Rosa e Rogério, e até mesmo aos que não pertenciam ao programa até esta data Anicleto, Yara, Tadeu e Roseli, meus agradecimentos pelo conjunto de excelência.

♦ Aos colegas do meu grupo Martha, Daniela Cabrini, Cândida, Eunice, Rubens, Betinha, Juliano, Nara, Daniela Balz, Michel, Rodrigo, Niraldo, Gisele, Rafaela, Carlos, Ednéia, Marina, Alessandra, Octávio, bem como os de outros grupos Cláudio, Biba, Rodrigo Peters, Sílvia, Maria Fernanda, Daniele, Zuleide, Daniel, Renata, Rui Daniel, Fabrícios Pamplona e Assini, Luciano, Belém, Leandro, George, Marcos, Filipe, Márcia, Rebeca e Nelson, obrigado pela convivência pacífica e integração nos eventos sociais e científicos.

- ♦ Ao pessoal de apoio, Patrícia Viana, Rosana (ex-técnica), Adenir, Pedro, Aline, Diana, Goreti, Nadir e Rita. Valeu a força.
- ♦ E se for dar uma volta no passado do prédio da Ferreira Lima, onde tudo começou, quanta gente boa, Sandra, Elza, seu Zeri, Seu Amaro, Robertão, Teresinha, Itamar, Jussara, Laura e Regininha, bem como os professores João Harger e Arizinho Sell, dá uma grande saudade.
- ♦ Aos animais, que foram sacrificados em prol da ciência, meus sinceros sentimentos
- ♦ A Deus, que se não existisse, nada disso teria acontecido.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS E ANEXOS (TABELAS).....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xvi
PUBLICAÇÕES.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <u>História das Cininas</u>	1
1.2. <u>Síntese e metabolização das cininas</u>	3
1.3. <u>Farmacologia das cininas</u>	6
1.4. <u>Estrutura dos receptores para as cininas</u>	7
1.5. <u>Caracterização dos receptores com antagonistas e radioligantes</u>	9
1.6. <u>Clonagem dos receptores das cininas</u>	12
1.7. <u>Sistemas de transdução acoplados aos receptores das cininas</u>	14
1.8. <u>As cininas nas vias aéreas</u>	17
1.8.1. <u>Função do epitélio e participação dos EpDRFs</u>	19
1.8.2. <u>O papel da COX nas vias aéreas</u>	21
1.8.3. <u>A via da L-arginina/NO no aparelho respiratório</u>	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. <u>Geral</u>	25
2.2. <u>Específicos</u>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. <u>Animais</u>	27
3.2. <u>Experimentos Funcionais</u>	27
3.2.1. <u>Isolamento e montagem das preparações</u>	27
3.2.2. <u>Análise do efeito contrátil em preparações sem epitélio</u>	29
3.2.2.1. <u>Efeito contrátil da BK na TC-E</u>	29
3.2.2.2. <u>Influência de diferentes classes de drogas que interferem sobre a cascata do ácido araquidônico araquidônico sobre a contração induzida pela BK</u>	29
3.2.2.3. <u>Influência de diferentes classes de drogas sobre a dessensibilização induzida pela BK na TC-E</u>	30
3.2.3. <u>Análise da resposta relaxante em preparações com epitélio intacto</u>	31
3.2.3.1. <u>Comparação do efeito relaxante da BK e PGE₂ na TC+E</u>	31
3.2.3.2. <u>Efeito de inibidores da COX e das NOS sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E</u>	31
3.2.3.3. <u>Efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E</u>	32
3.2.3.4. <u>Efeito de antagonistas dos receptores Ep para a PGE₂ sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E</u>	33
3.2.3.5. <u>Efeito de bloqueadores de canais de potássio sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E</u>	33
3.3. <u>Liberação de PGE₂ em resposta à incubação de BK</u>	34
3.4. <u>Papel das enzimas COX-1 e 2 e de óxido nítrico sintases nas respostas relaxantes da BK na traquéia de cobaia</u>	34
3.4.1. <u>Preparação dos tecidos</u>	34
3.4.2. <u>Extração de proteína para análise de Western blot</u>	35

3.4.3. <u>Ensaio de Western blot</u>	36
3.5. <u>Drogas</u>	37
3.6. <u>Análise Estatística</u>	40
4. RESULTADOS	42
4.1. <u>Efeito de inibidores de COX-1 e -2 sobre a resposta contrátil para a BK na traquéia de cobaias sem epitélio</u>	42
4.2. <u>Efeito de inibidores de COX-2 e da NOS sobre a dessensibilização da resposta contrátil induzida pela BK na TC-E</u>	45
4.3. <u>Efeito relaxante da bradicinina e da prostaglandina E₂ na traquéia isolada de cobaia com epitélio</u>	46
4.4. <u>Efeito de inibidores das COX-1 e -2 e da NOS no relaxamento da BK e PGE₂ na traquéia de cobaia</u>	48
4.5. <u>Influência de diferentes inibidores enzimáticos e de bloqueadores de canais de potássio sobre a resposta relaxante à BK</u>	51
4.6. Caracterização do(s) subtipo(s) de receptor(es) EP envolvidos nas respostas relaxantes induzidas pela BK e pela PGE ₂ na traquéia de cobaia.....	52
4.7. <u>Influência de inibidores da tirosina quinase na resposta relaxante induzida pela BK</u>	53
4.8. <u>Liberação de PGE₂ pela BK na TC+E</u>	54
4.9. Efeito da BK sobre a expressão protéica das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, nNOS e iNO na TC+E.....	55
5. DISCUSSÃO	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE ABREVIACÕES

AA, ácido araquidônico

BK_{Ca}, canal de potássio ativado por Ca²⁺ de alta condutância

COX, ciclooxigenase

COX-1, ciclooxigenase-1

COX-2, ciclooxigenase-2

EGF, fator de crescimento epidermal

EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal

EGFR-Trk, tirosina quinase ligada ao receptor do fator de crescimento epidermal

eNOS, sintase do óxido nítrico endotelial

EP, receptores EP para a prostaglandina E₂

FLA₂, fosfolipase A₂

FLC, fosfolipase C

GPCRs, receptores acoplados à proteína G

IK1, canal de potássio ativado por Ca²⁺ de condutância intermediária.

iNOS, sintase do óxido nítrico induzível

Kv, canal de potássio ativado por voltagem

LPS, lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno

MEK 1/2, quinase da proteína quinase ativada por mitógeno

NF-κB, fator nuclear-κB

NOS, sintase do óxido nítrico neuronal

NOS, sintase do óxido nítrico

PI₃-K, fosfatidilinositol-3-quinase

PKA, proteína quinase A

PKC, proteína quinase C

TC, traquéia de cobaia

TC+E, traquéia de cobaia com epitélio intacto

TC-E, traquéia de cobaia sem epitélio

Trk, tirosina quinase

ÍNDICE DE FIGURAS E ANEXOS

Figura 1 - Síntese e metabolização das cininas.....	6
Figura 2 - Vias de transdução normalmente ativadas em resposta à estimulação do receptor B ₂ pela BK.....	18
Figura 3 – Efeito do valeril salicilato, indometacina, diclofenaco, fenidona ou AH 6809 na contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio.....	43
Figura 4 - Efeito do furagrelato e L-655,240 e do LY 171883 398 e MK 571, na contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio.....	44
Figura 5 - Efeito da cicloheximida ou da beclometasona, na contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio.....	44
Figura 6 - Dessensibilização tempo-dependente induzida pela BK na TC-E na ausência ou na presença de indometacina, diclofenaco ou NS 398, valeril salicilato or N ^o -nitro-L-arginina na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	45
Figura 7 – Registros típicos demonstrando o aumento dependente do tempo nas respostas relaxantes induzidas pela BK ou pela PGE ₂ na TC+E. Curvas concentração-resposta relaxantes completas à BK ou à PGE ₂ na traquéia isolada de cobaia com epitélio sob tônus espontâneo. Efeito relaxante observado com a combinação de concentrações sublimiarias de BK e de PGE ₂ na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	47

Figura 8- Efeito dos inibidores não-seletivos da COX, indometacina e piroxicam no relaxamento induzido pela bradicinina em traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	49
Figura 9 – Efeito dos inibidores seletivos da COX-2, DFU, NS 398 e rofecoxibe e do na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	50
Figura 10 – Efeito inibitório concentração-dependente do inibidor não-seletivo da NOS, 7-NINA, no relaxamento induzido pela BK na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	51
Figura 11 – Efeito da ouabaína sobre o relaxamento induzido pela BK ou pela PGE ₂ na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	
Figura 12 – Efeito dos antagonistas dos receptores EP ₁ (SC 19220), EP ₁ /EP ₂ (AH 6809), EP ₃ (L 826266) ou EP ₄ (L 161982) sobre o relaxamento induzido pela BK ou pela PGE ₂ na traquéia isolada de cobaia com epitélio	53
Figura 13 – Efeito relaxante da BK na ausência ou na presença de herbimicina A (HERBA) e tirfostin AG 490 na traquéia isolada de cobaia com epitélio.....	54
Figura 14 - Efeito de inibidores da COX-1 (SC 560), da COX-2 (NS 398), da síntese de óxido nítrico (aminoguanidina, AMG), da tirosina quinase relacionada ao receptor do fator de crescimento epidermal (tirfostin AG 490) ou do antagonista seletivo do receptor B ₂ (HOE 140) sobre a geração de PGE ₂ induzida pela BK na traquéia de cobaia com epitélio.....	56

Figura 15 - *Western blot* representativo, mostrando a expressão constitutiva das proteínas da COX-2, da eNOS e da nNOS na ausência ou na presença de BK na traquéia de cobaia com epitélio ou sem epitélio.....57

ANEXO I – Tabela 1- Influência de diferentes drogas que interferem sobre a via da adenilato ciclase/AMPC no relaxamento induzido pela bradicinina em traquéia isolada de cobaia com epitélio..... 128

ANEXO II - Tabela 2 - Influência de diferentes drogas que interferem nas vias da fosfolipase C, fosfolipase A₂ proteína quinase C e PI₃ quinase sobre o relaxamento induzido pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia com epitélio..... 129

ANEXO III - Tabela 3 - Influência de diferentes drogas inibidoras da síntese protéica e de fatores de transcrição no relaxamento induzido pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia com epitélio 130

ANEXO IV - Tabela 4 - Influência de diferentes drogas bloqueadores de canais de potássio e inibidores do EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) no relaxamento induzido pela bradicinina na traquéia isolada de cobaia com epitélio131

RESUMO

Este estudo investiga os mecanismos pelos quais a bradicinina (BK) causa resposta contrátil ou relaxante via ativação dos receptores B₂ em segmentos de traquéia de cobaia com (TC+E) e sem epitélio (TC-E) *in vitro*. Além disso, foram investigados para efeito de comparação os mecanismos transduccionais envolvidos na resposta relaxante da prostaglandina E₂ (PGE₂) nesta preparação, através de estudos funcionais, bioquímicos e técnicas de biologia molecular. A adição de BK (100 nM), causou contração sustentada na TC-E, contudo a obtenção de curvas sucessivas causou progressiva taquifilaxia. A taquifilaxia induzida pela BK não foi afetada pela L-NOARG (inibidor da óxido nítrico sintase [NOS], 100 µM) ou pelo valeril salicilato (um inibidor da ciclooxigenase-1 [COX-1], 30 µM), mas foi prevenida por uma baixa concentração de indometacina (INDO), diclofenaco (ambos inibidores não seletivos de COX, 3 nM cada um) ou de NS 398 (um inibidor preferencial da COX-2, 10 nM). Além disso, altas concentrações de INDO, diclofenaco, fenidona (um inibidor de ciclooxigenase [COX] e lipooxigenase [LOX]), ou o NS 398, causaram inibições concentração-dependente da contração induzida pela BK. Entretanto, o inibidor seletivo da COX-1 valeril salicilato, furagrelato (um inibidor da sintase de tromboxano), L-655,240 (antagonista do receptor de tromboxano), LY 171883 (antagonista do receptor de leucotrieno D₄/E₄), or MK-571 (antagonista do receptor CysLT(1) dos leucotrienos). O antagonista dos receptores EP₁/EP₂ da PGE₂, o AH 6809 (0,1 a 30 µM) inibiu significativamente e concentração-dependente a contração induzida pela BK na TC-E, indicando que a liberação de prostanóides, possivelmente PGE₂, atuando em receptores EP₁/EP₂, é a responsável pela contração da TC-E. Também neste estudo, nós investigamos algumas das vias sinalizadoras envolvidas no relaxamento induzido pela BK em segmentos com epitélio intacto de traquéia de cobaia (TC+E). A BK causou relaxamento tempo e concentração dependente da TC+E.

Respostas similares foram observadas para a prostaglandina E_2 (PGE_2) e a combinação de concentrações sub-limiar de BK junto com concentrações sub-limiar PGE_2 potencializaram a resposta relaxante. O inibidor não-seletivo da ciclooxigenase (COX) indometacina ou piroxicam, ou os inibidores seletivos de COX-2 DFU, NS 398 ou rofecoxibe, mas não o inibidor seletivo de COX-1 o SC 560, aboliram o relaxamento causado pela BK. O inibidor preferencial da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), o 7-NINA também inibiu de forma concentração-dependente o relaxamento da BK, sem contudo abolir completamente esta resposta. O inibidor seletivo da COX-1, o SC 560, bem como os glicocorticóides dexametasona (DEXA) e beclometasona (BECLO), não interferiram no efeito relaxante da BK ou da PGE_2 . Já o inibidor não-seletivo da tirosina quinase (Trk), a herbimicina A (HERBA) e o inibidor da Trk ligada ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR-Trk), o AG 490 da mesma forma que os inibidores da COX, aboliram o relaxamento causado pela BK, sem afetar, contudo, as respostas à PGE_2 . A incubação de diferentes inibidores enzimáticos ou de bloqueadores de canais iônicos, incluindo inibidores da via da adenilato ciclase/AMPC/proteína quinase A (PKA) e guanilato ciclase/GMPc/proteína quinase G (PKG), inibidores da fosfolipase A_2 (FLA_2), inibidores da fosfolipase C (FLC), da proteína quinase C (PKC), o inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (PI_3K), o inibidor do fator nuclear κ B (NF- κ B), o inibidor da p38 MAP quinase (MAPK). Também diferentes bloqueadores de canais de K^+ e ainda inibidores do(s) fator(e)s hiperpolarizante(s) derivado(s) do endotélio (EDHF), não afetou de forma significativa as respostas relaxantes à BK ou à PGE_2 . A BK causou marcado aumento nos níveis de PGE_2 , um efeito que foi prevenido pelo NS 398, HOE 140 ou AG 490. a expressão da COX-2 não difere em preparações com ou sem epitélio, e não foi alterada pela estimulação com BK. Entretanto, a incubação com BK aumentou significativamente a expressão da eNOS e nNOS, independente da

integridade do epitélio. Em conjunto, estes resultados sugerem que a contração induzida pela BK na TC-E envolve a ativação de receptores B₂ e liberação de prostanóides derivados da via da COX₂. Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que quanto à sinalização intracelular envolvidas nas respostas contracturantes e relaxantes para a BK tem a participação da COX-2 constitutiva, com liberação de elevados níveis de PGE₂, que por sua vez ativaria receptores EP₃. Acopladas às ações da BK na TC, estariam as enzimas eNOS e nNOS responsáveis pela liberação de NO, tanto do epitélio como dos terminais nervosos e/ou músculo liso, que exerce um importante efeito relaxante sobre este tecido. Do ponto de vista das vias intracelulares os resultados indicam que vias de sinalização comumente associadas às ações não parecem participar das ações da BK na TC. Um dos resultados mais relevantes foi a demonstração de que o EGFR-Trk e a bomba Na⁺-K⁺-ATPase parecem ser importantes vias sinalizadoras das ações relaxantes da BK na TC. Apenas a resposta contrátil, mas não a resposta relaxante à BK é susceptível à dessensibilização, um efeito que pode ser completamente prevenido por inibidores da COX-2. Assim, com base nos presentes resultados, pode-se afirmar que receptores B₂ da BK em conjunto com prostanóides e NO exercem um papel modulador importante nas vias aéreas.

ABSTRACT

This study investigates some of the mechanisms by which bradykinin (BK) triggers contraction of epithelium-denuded strips of guinea pig trachea (GPT-E). Addition of BK (100 nM), at 30 min intervals, induced progressive tachyphylaxis, which was complete after 4 h. The tachyphylaxis induced by BK was unaffected by the L-NOARG (nitric oxide synthase inhibitor, 100 μ M) or by valeryl salicylate (a cyclooxygenase-1 (COX-1) inhibitor, 30 μ M), but was completely prevented by a very low concentration of either indomethacin, diclofenac or by NS 398 (3 nM each). Furthermore, higher concentrations of indomethacin, diclofenac, NS 398 or phenidone caused graded inhibition of responses to BK, with IC₅₀ values of 0.28, 0.08, 46.3 and 0.15 μ M, respectively. AH 6809 also inhibited the contractile response to BK with IC₅₀ value of 2.7 μ M. However, the selective COX-1 inhibitor valeryl salicylate, furegrelate, (a thromboxane synthetasis inhibitor), L-655,240 (0.03 μ M, a thromboxane receptor antagonist), LY 171883 (0.3 μ M, a leukothryene D₄/E₄ receptor antagonists), or MK-571 (0.3 μ M, a CysLT(1)-receptor antagonist to leukotrienes). Also, In this study, we investigated some of the signalling pathways involved in BK-induced relaxation in epithelium intact strips of the guinea pig trachea (GPT+E). BK induced time- and concentration-dependent relaxation of GPT+E. Similar responses were observed for prostaglandin E₂ (PGE₂) or the combination of sub-threshold concentrations of BK plus PGE₂. The non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitors indomethacin or pyroxicam, or the selective COX-2 inhibitors DFU, NS 398 or rofecoxib, but not the selective COX-1 inhibitor SC 560, all abolished BK-induced relaxation. The tyrosine kinase (Trk) inhibitors herbimycin A and AG 490 such as ouabain also abolished BK-induced relaxation in GPT+E. 4. The non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor 7-NINA concentration-dependently inhibited BK-effects. BK-induced relaxation was prevented by the selective antagonists for EP₃ (L 826266), but not by EP₁ (SC 19221), EP₁/EP₂ (AH 6809) or EP₄ (L 161982) receptor antagonists. Otherwise, the selective inhibitors of protein kinases A, G and C, MAP kinases, phospholipases C and A₂, NF- κ B or potassium channels, all failed to significantly interfere with BK-mediated relaxation. BK caused a marked increase in PGE₂ levels, an effect that was prevented by NS 398, HOE 140 or AG 490. COX-2 expression did not differ in preparations with or without epithelium, and it was not changed by BK stimulation. However, incubation with BK significantly increased the eNOS and nNOS expression, independent of the epithelium integrity. Together, these results suggest that BK-induced contraction in GPT involves activation of B₂ receptors and release of prostanoids derived from COX2 pathways. The response to BK exhibits marked tachyphylaxis, an effect which was independent of the nitric oxide pathway, but prevented by a very low concentration of both non-selective COX inhibitors indomethacin and diclofenac and COX-2 selective inhibitor NS 398, but not by valeryl salicylate, indicating mediation via COX-2 arachidonic acid metabolites. Our results indicate that BK-induced relaxation in GPT+E depends on prostanoids (probably PGE₂ acting via EP₃ receptors) and NO and seems to involve complex interactions between kinin B₂ receptors, COX-2, nNOS, eNOS and tyrosine kinases.

PUBLICAÇÕES

Parte dos resultados do presente estudo foram publicados em Periódicos internacionais:

SCHLEMPER, V. & CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the contraction induced by bradykinin in the guinea pig epithelium-denuded trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**:360-7, 2002

SCHLEMPER, V., MEDEIROS, R, FERREIRA, J., CAMPOS, M. M. & JOÃO B. CALIXTO. Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact guinea pig trachea *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, (no prelo), 2005.

1. INTRODUÇÃO

1.1. História das cininas

A história das cininas começou quando dois cirurgiões franceses, Abelous & Bardier (1909) *apud* Bhoola, Figueroa e Worthy (1992), observaram redução transitória considerável na pressão sanguínea, quando injetavam pela via intravenosa, frações extraídas de urina humana e de outros mamíferos em cães. Este efeito hipotensivo da urina foi atribuído por outros autores à presença de uma substância termolábil, não dialisável (a qual denominaram “Kleislaufhormon”) supondo a existência de um hormônio circulante, originado fora dos rins e excretado na urina. Esta ação foi atribuída a uma substância com funções fisiológicas relevantes sobre coração e vasos sanguíneos (Frey e Kraut, 1926 *apud* Fritz, Schmidt e Dietze, 1989; Frey e Kraut, 1928 *apud* Bhoola, Figueroa e Worthy, 1992). A substância, com efeitos semelhantes aos de hormônio, foi denominada “kallikrein” (calicreína), numa sinonímia grega para pâncreas (calicreas), devido às altas concentrações desta enzima neste órgão, possível local de origem (Kraut *et al.*, 1930 *apud* Fritz, Schmidt e Dietze, 1989). Foi sugerido que a calicreína só se tornaria ativa em meio mais ácido nos tecidos, produzindo redução da pressão sanguínea por exercer ação direta sobre vasos sanguíneos e no miocárdio. Frey, persistindo em seus estudos, passou a usar preparações de calicreína manufaturadas em seu próprio laboratório e, posteriormente, na indústria farmacêutica Bayer da Alemanha, com o nome “Padutin”. Ao mesmo tempo houve a descoberta de um inibidor extremamente potente da calicreína em órgãos bovinos (Bauer *et al.*, 1929; Kraut *et al.*, 1930 *apud* Fritz, Schmidt e

Dietze, 1989), a aprotinina (Trasylo[®], Bayer), que mais tarde foi utilizada terapeuticamente para vários fins.

Posteriormente, Werle *et al.* (1937) *apud* Fritz, Schmidt e Dietze (1989) descobriram que a incubação da calicreína com sangue causava aumento considerável de sua atividade. Descobriu-se ainda, a partir desses resultados, que a calicreína é uma enzima proteolítica, capaz de hidrolisar proteínas plasmáticas, chamadas de calidinogênio (Werle, 1948 *apud* Fritz, Schmidt e Dietze, 1989), produzindo um polipeptídeo básico (inicialmente chamado DK - *darmkontrhierende Substanz* - ou substância contracturante do intestino, posteriormente chamada de calidina). A inativação da calidina por substâncias do plasma e tecidos era irreversível e inicialmente atribuída à degradação da calidina por cininases. A partir da identificação das cininases como peptidases, a degradação da calidina poderia ser prevenida utilizando inibidores que atuam sobre o aminoácido cisteína do sítio ativo da enzima (Werle e Grunz, 1939 *apud* Fritz, Schmidt e Dietze, 1989). Em 1967, a inativação da BK pelas cininases do pulmão foi descrita por Ferreira e Vane (1967).

Paralelamente ao estudo de Werle, o farmacologista brasileiro Maurício Rocha e Silva e colaboradores descobriram outra cinina distinta da calidina, que foi chamada de bradicinina (BK) (Rocha e Silva *et al.*, 1949). Ao incubarem tripsina com sangue, Rocha e Silva *et al.* (1949) observaram que ocorria a liberação de um agente que contraía o íleo de cobaia de maneira muito lenta (bradi), em comparação com as respostas causadas pela histamina ou pela acetilcolina. Numa analogia a esta resposta, os autores chamaram o novo agente de “bradicinina” (Andrade e Silva, 1956). A identificação da seqüência da

BK não foi tarefa fácil para Elliot (1970) que chegou à conclusão de que a BK é um nonapeptídeo (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Apenas no ano de 1970 várias ações biológicas foram descobertas e a utilização de compostos sintéticos permitiu uma evolução rápida na farmacologia das cininas.

1.2. Síntese e metabolização das cininas

Atualmente, está claro que as cininas são peptídeos vasoativos importantes formados localmente, em fluídos e tecidos orgânicos, a partir de uma globulina precursora presente no plasma chamada cininogênio, durante processos inflamatórios ou traumas teciduais (Farmer e Burch, 1991; Barnes, 1992). As cininas são formadas a partir de α -globulinas, os cininogênios de baixo e de alto peso molecular pela ação de cininogenases, que incluem a calicreína plasmática e a tecidual. O cininogênio de alto peso molecular está presente somente no plasma, embora também seja encontrado nos tecidos, enquanto que o cininogênio de baixo peso molecular ocorre principalmente nos tecidos. As duas cininas, a BK e a calidina, são formadas em humanos: a BK (um nonapeptídeo) é gerada a partir da degradação do cininogênio de alto peso molecular e a lisil-BK (calidina, um decapeptídeo), a partir do cininogênio de baixo peso molecular. A calidina é rapidamente convertida em BK pela ação da enzima aminopeptidase-N. O cininogênio de alto peso molecular é o substrato preferencial para a ação da calicreína plasmática, que é gerada a partir da pré-calicreína inativa pelo contato com certas superfícies carregadas negativamente, incluindo componentes da membrana basal e proteoglicanos (como a heparina liberada de mastócitos). As calicreínas teciduais são produzidas em secreções

glandulares e liberam cininas de ambos os cininogênios de alto e de baixo peso molecular (Figura 1). Outras proteases produzidas em células inflamatórias podem também gerar cininas a partir de cininogênios (Regoli e Barabé, 1980; Carretero e Scicli, 1990; Bhoola *et al.*, 1992).

Diversas enzimas proteolíticas estão implicadas no metabolismo das cininas, embora a distinção tenha sido feita entre enzimas do sangue ou localizadas na superfície das células endoteliais, epiteliais ou outras células (Ferreira e Vane, 1967; Ferreira, 1976). Entre as enzimas ativas na porção amino-terminal das cininas, apenas a aminopeptidase está presente no sangue (Erdös *et al.*, 1963). Esta cliva o resíduo lisil da lisil-BK e os resíduos metionil e lisil da metionil-lisil-BK, mas é inativa na ligação Arginina-Prolina da BK. As enzimas mais importantes envolvidas na degradação das cininas são as cininases I e II, duas metaloproteinases. A cininase I (também chamada de carboxipeptidase N) é uma exopeptidase que remove a arginina C-terminal da BK e da lisil-BK. Por outro lado, a cininase II é uma carboxipeptidase que cliva o dipeptídeo fenilalanina-arginina, e assim inativa a BK. Os melhores substratos para a cininase II são a BK, a lisil-BK e especialmente a metionil-lisil-BK. A cininase I está presente no sangue, enquanto que grande parte da cininase II está na superfície das células endoteliais do pulmão e em vários outros leitos vasculares e tecidos (Erdös e Yang, 1967; Ferreira & Vane, 1967; Erdös e Yang, 1970; Ryan *et al.*, 1970) (Figura 1). O processo de inativação rápida das cininas na circulação levou ao desenvolvimento de substâncias capazes de inibir a atividade das cininases. Inicialmente verificou-se que o veneno extraído da *Bothrops jararaca* era capaz de potencializar a contração do íleo de cobaia ou a resposta

hipotensora causada pela BK (Ferreira, 1965). O fator responsável por este efeito foi chamado de fator potencializador da BK (BPF) e sua atividade foi correlacionada com a inibição da inativação enzimática das cininas (Ferreira e Vane, 1967). Posteriormente esse fator foi isolado e sintetizado (Stewart *et al.*, 1971) e, em 1977, foi desenvolvido a partir dele o primeiro inibidor da cininase II, o captopril, e muitos outros inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) como o enalapril e o ramipril (Ondetti *et al.*, 1977).

A importância relativa das cininases varia de acordo com a espécie, com o tipo de fluido biológico e com o sítio de formação da enzima (Bhoola *et al.*, 1992). Em humanos, os níveis circulantes das cininas são primariamente regulados pela cininase I, enquanto que em superfícies endoteliais e no leito pulmonar vascular, a ação da cininase II é mais importante. A cininase II possui maior afinidade pela BK e pela calidina do que a cininase I. Este fato sugere que a formação dos metabólitos des-Arg⁹ é observada em exsudatos inflamatórios, que são compostos por proteínas do plasma, incluindo as carboxipeptidases que metabolizam as cininas pela via da cininase I. Além disso, a formação de fibrina, típica de muitos exsudatos, aumenta expressivamente a atividade da cininase I (Chercurite *et al.*, 1987; Heindriks, 1990). O predomínio da atividade da cininase I sobre a da cininase II pode ser observado no fluido sinovial ou na secreção nasal de pacientes com rinite alérgica (Proud *et al.*, 1987).

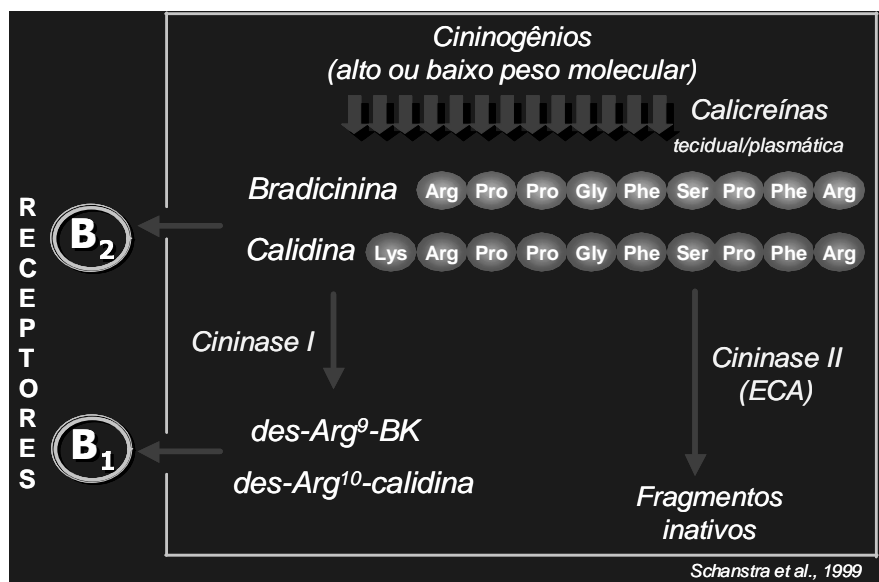


Figura 1 – Síntese e metabolização das cininas: As cininas são formadas a partir de α -globulinas, os cininogênios de baixo e de alto peso molecular pela ação da caliceína plasmática e a tecidual. As duas cininas, a BK (um nonapeptídeo) é gerada a partir da degradação do cininogênio de alto peso molecular e a lisil-BK (calidina, um decapeptídeo), a partir do cininogênio de baixo peso molecular. A calidina é rapidamente convertida em BK pela ação da enzima aminopeptidase-N. As enzimas cininases I e II degradam a BK. Adaptado de Schanstra *et al.*, 1999.

1.3. Farmacologia das cininas

Depois de formadas, as cininas BK e a calidina exercem uma série de efeitos biológicos que envolvem, principalmente, a regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa vascular e não-vascular, estão envolvidas na regulação da pressão arterial, no transporte de glicose e de eletrólitos, controlam glândulas exócrinas e estimulam a reabsorção óssea e a proliferação celular (para revisão ver: Regoli e Barabé 1980; Marceau *et al.*, 1983; Hall 1992; Sethi e Rozengurt, 1991; Bhoola *et al.*, 1992; Marceau 1998; Calixto *et al.*, 2000). Além disso, as cininas participam de vários eventos de processos inflamatórios que incluem dilatação venular, aumento da permeabilidade

vascular, além da estimulação de fibras sensoriais aferentes do tipo C e A δ causando dor (Roch-Arveiller *et al.*, 1985; Hargreaves *et al.*, 1988; Proud e Kaplan, 1988; Calixto *et al.*, 2000).

Estas ações sugerem que as cininas podem participar de vários estados fisiopatológicos, tais como reações alérgicas, rinite viral, asma, pancreatite, peritonite ou artrite reumatóide (Regoli e Barabé, 1980; Steranka *et al.*, 1988; Bathon e Proud, 1991; Hall, 1992). Também, por participarem do controle da pressão arterial, são importantes em certos tipos de hipertensão ou durante o desenvolvimento do choque séptico (Marceau e Regoli, 2004).

1.4. Estrutura dos receptores para as cininas

As ações da BK são mediadas por receptores da superfície celular os quais são membros da família dos receptores acoplados à proteína G. Há mais de 20 anos atrás Regoli e colaboradores, usando estudos farmacológicas *in vitro*, postularam a existência de dois subtipos de receptores para a BK, os quais foram designados de B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980). Os receptores B₂ estão amplamente distribuídos e encontram-se pré-formados (constitutivos) nos tecidos, e os receptores B₁ são extremamente regulados a partir de um estímulo pró-inflamatório (induzidos) (Regoli e Barabé, 1980; Marceau e Regoli, 2004). Entretanto, somente alguns anos atrás este conceito tornou-se firmemente estabelecido, como resultado da descoberta e desenvolvimento de antagonistas seletivos para os dois subtipos de receptores e a clonagem e expressão de ambos os subtipos (Hall e Morton, 1997).

Os receptores B₁ são seletiva e potentemente ativados pelos metabólitos des-Arg-cininas, formados pela enzima cininase I (ex: Lis-[des-Arg⁹]-BK e [des-Arg⁹]-BK. Estes receptores são inibidos pelos antagonistas sintéticos [Leu⁸][des-Arg⁹]-BK (Trifilieff *et al.*, 1993). O ligante natural, BK, é ativo no receptor B₁, mas com potência muito menor dos que os metabólitos des-Arg-cininas, derivados da cininase I. O perfil farmacológico dos receptores B₁ difere entre as espécies animais. Em primeiro lugar, a [des-Arg¹⁰]calidina tem muito maior afinidade para o receptor B₁ humano do que a [des-Arg⁹]-BK. Entretanto, esta diferença é menor para o receptor do coelho, enquanto que a [des-Arg⁹]-BK têm maior afinidade para os receptores B₁ de rato e de camundongo (MacNeil *et al.*, 1995). A literatura confirma que os perfis farmacológicos dos receptores B₁ de humano e de coelho são similares e que eles contrastam com os perfis do receptor do rato e do camundongo (Hess *et al.*, 1994; Hess, 1997; Gobeil *et al.*, 1997). Estas observações são refletidas nas homologias das seqüências de aminoácidos. Assim, o receptor B₁ humano tem apenas um aminoácido a menos do que o receptor B₁ do coelho e tem maior homologia (cerca de 78%) em comparação com outras espécies de roedores. Os receptores B₁ de rato e de camundongo têm menos aminoácidos do que os de coelho e de seres humanos e mostram na seqüência uma homologia de 89%. Embora a seqüência de aminoácidos e a homologia poderiam sugerir uma similaridade do receptor B₁ de cão com os receptores de humano e de coelho, estudos de ligação revelaram o oposto. A seletividade do agonista é similar aos receptores B₁ de roedores e difere dos receptores de humano e de coelho (Hess *et al.*, 2001), um fenômeno que permanece por ser melhor explicado.

Os receptores B₂ apresentam maior afinidade para a Lis-BK (calidina) e a BK do que para os metabólitos des-Arg-cininas, derivados da cininase I, que preferencialmente ativam receptores B₁ (Farmer e Burch, 1991). A BK é o ligante natural para os receptores B₂, mas ela seletivamente ativa os receptores B₂ mais do que os receptores B₁. O perfil farmacológico completo dos receptores B₂ entre espécies não está claramente definido como no caso do receptor B₁ (Regoli *et al.*, 1997), onde os perfis do receptor de humanos e de coelhos contrastam com o receptor de roedores, havendo diferença na seqüência de homologias. Isto pode ser devido à diversidade em duas regiões importantes da ligação peptídica, o quarto domínio extracelular e o sétimo domínio trans-membrana (Rupniak *et al.*, 1997) nos receptores B₂ do homem, rato, camundongo e coelho. O perfil farmacológico do receptor B₂ clonado de cão mostrou propriedades agonísticas clássicas para à BK e à lis-BK neste subtipo de receptor, ou seja, alta afinidade (Hess *et al.*, 2001). Muitos antagonistas foram desenvolvidos e usados na investigação dos papéis fisiológicos e fisiopatológicos dos receptores B₂.

1.5. Caracterização dos receptores com antagonistas e radioligantes

O envolvimento dos receptores das cininas em diferentes patologias, bem como seus efeitos fisiológicos, podem ser confirmados pelo uso de uma ferramenta farmacológica bastante importante, os antagonistas seletivos. Os primeiros antagonistas seletivos e competitivos para os receptores B₂ tiveram a estrutura baseada no protótipo [D-Phe⁷]-BK (Vavrek e Stuart, 1985). A segunda geração de antagonistas B₂ teve origem com a D-Arg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (HOE 140, icatibante) (Lembeck *et al.*,

1991) o qual é seletivo para os receptores B₂ e metabolicamente resistente à clivagem enzimática (Trifilieff *et al.*, 1993). Sua característica é de apresentar a inserção de dois aminoácidos sintéticos Tic e Oic, nas posições 7 e 8 (Wirth *et al.*, 1991). A essa classe pertencem o NPC 17731 e o NPC 17761, que têm um resíduo alifático (D-cis-propoxiprolina) na posição 7. Essa característica confere aumento significativo da meia vida, facilitando a caracterização dos efeitos das cininas *in vitro* e *in vivo* (Marceau *et al.*, 1998). O progresso no desenvolvimento de antagonistas não peptídicos e seletivos para receptores B₂ foi bastante rápida, até o surgimento do WIN 64338, do FR 173657, do FR 167344, do NPC 18884 e a bradizida, empregados em centenas de estudos experimentais e clínicos. O B-9430 (D-Arg-[Hip³, Igl⁵, D-Igl⁷, Oic⁸]-BK) é um antagonista misto dos receptores B₁ e B₂, que ilustra o fato de um simples farmacóforo poder antagonizar ambos os receptores (Stewart, 2004). Um dímero deste último, o B-9870 (CU201), que mantém o antagonismo do receptor, tem ações citotóxicas sobre células tumorais (Stewart, 2004; Chan *et al.* 2002). A modificação na estrutura dos antagonistas peptídicos para o receptor B₂ forneceu dois potentes antagonistas B₁ seletivos, a des-Arg-[Hip³, Thi⁵, D-Tic⁵, Oic⁸, des-Arg⁹]-BK ([des-Arg¹⁰]-HOE 140) e a des-Arg⁹-NPC 17731 (Stewart *et al.*, 1999). Os avanços nesse campo culminaram com a criação dos antagonistas seletivos dos receptores B₁, o R715 e o B9958, e do antagonista misto B₁/B₂, o B9430 (Regoli *et al.*, 1998). Recentemente foram descritos alguns antagonistas não peptídicos dos receptores B₁ (Su *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2004).

O primeiro antagonista competitivo para os receptores B₁ das cininas descrito na literatura foi o [Leu⁸]des-Arg⁹-BK, mas que apresenta atividade agonística sobre os

receptores B₁. A modificação na estrutura dos antagonistas peptídicos para o receptor B₂ forneceu dois potentes antagonistas seletivos B₁, o Des-Arg-[Hip³, Thi⁵, D-Tic⁵, Oic⁸, des-Arg⁹]-BK ([des-Arg¹⁰]-HOE 140) e o des-Arg⁹-NPC 17731 (Stewart *et al.*, 1999). Os avanços nesse campo culminaram com a criação dos antagonistas seletivos dos receptores B₁, o R715 e o B9958, e do antagonista misto B₁/B₂, o B9430 (Regoli *et al.*, 1998).

Estudos utilizando radioligantes também representam uma ferramenta farmacológica importante para a caracterização das respostas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ (Marceau e Bachvarov, 1998; Blais *et al.*, 2000). Os primeiros estudos foram realizados com a [³H]-BK, ligante mais utilizado para a caracterização dos receptores B₂. Por outro lado, para estudos que envolvem os receptores B₁, o principal ligante é a [³H]-des-Arg¹⁰-calidina. Até o momento, foram realizados estudos de ligação específica (*binding*) para os receptores B₂ em preparações teciduais ou em diversas culturas celulares tais como miométrio de rata (Liebmann *et al.*, 1987), íleo, pulmão e traquéia de cobaia (Manning *et al.*, 1986; Farmer *et al.*, 1989; 1991) e fibroblastos de pulmão humano (Roscher *et al.*, 1990). Entretanto, para os receptores B₁, a maior parte dos estudos com radioligantes é descrita em culturas celulares, provavelmente em decorrência da baixa densidade destes receptores nos tecidos (Hall e Morton, 1997). Resultados relevantes foram realizados em cultura de células primárias de músculo liso de aorta de coelho (Schneck *et al.*, 1994) e de células mesangiais de rato (Bascands *et al.*, 1993) e em linhagens RAW 264.7 de macrófagos (Burch e Kyle, 1992).

1.6. Clonagem dos receptores das cininas

Após a clonagem inicial do receptor B₂ de ratos (McEachern *et al.*, 1991), estudos empregando a clonagem baseada em homologia, identificaram a seqüência codificadora para o receptor B₂ humano (Hess *et al.*, 1992; Eggerickx *et al.*, 1992), em camundongos (McIntyre *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994), em coelhos (Bachvarov *et al.*, 1995), em cobaias (Farmer *et al.*, 1998) e em cães (Hess *et al.*, 2001). Existe uma homologia de 82-92% entre os genes que codificam os receptores B₂ nas diferentes espécies (Prado *et al.*, 2002). De maneira similar, a clonagem do receptor B₁ em tecido humano (Menke *et al.*, 1994) permitiu a determinação das seqüências para o receptor B₁ em outras espécies, incluindo coelho (MacNeil *et al.*, 1995), camundongo (Pesquero *et al.*, 1996), rato (Ni *et al.*, 1998), cão (Hess *et al.*, 2001) e macaco (Hess *et al.*, 2002). Em comparação com os receptores B₂, os genes que codificam os receptores B₁ de diferentes espécies apresentam homologia de cerca 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 nos cromossomos 14, 12 e 6 e separados entre si apenas por aproximadamente 12, 8 e 10 kilobases, respectivamente (Cayla *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, geniturinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (para revisão ver: Hall, 1992; Hall e Morton, 1997; Calixto *et al.*,

2000; 2004). Por outro lado, o nível de expressão do receptor B₁ é geralmente baixo ou mesmo ausente em situações fisiológicas, podendo esses receptores serem induzidos por vários estímulos, incluindo lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (LPS), citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-8, fator de necrose tumoral- α [TNF- α), fatores de crescimento, endotoxinas, irradiação ultravioleta (para revisão ver: Marceau *et al.*, 1997; Calixto *et al.*, 2004). A expressão do receptor B₁ pode ser regulada de maneira transcricional e pós-transcricional. A região reguladora do gene deste receptor possui elementos responsivos para diversos fatores de transcrição, tais como o NF κ B, AP1, CREB, Oct-1, p53 entre outros (Pesquero *et al.*, 1994; Ni *et al.*, 1998; Angers *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). A ativação destes fatores de transcrição *in vivo* ou *in vitro* por citocinas, endotoxinas ou LPS aumenta a síntese *de novo* do receptor B₁ (Marceau, 1997; Calixto *et al.*, 2004). Além disso, 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).

A grande semelhança entre os dois genes que codificam os receptores B₁ e B₂ sugere que estes possam ser produtos de uma antiga duplicação gênica (Hess *et al.*, 2002). Além dos receptores encontrados em mamíferos, receptores para as cininas foram clonados em aves (Schroeder *et al.*, 1997) e peixes (*zebrafish*; Duner *et al.*, 2002). Analisando o alinhamento das seqüências, os receptores para cininas de outras espécies são bastante similares aos receptores B₂ dos mamíferos (Hess *et al.*, 2002).

1.7. Sistemas de transdução acoplados aos receptores das cininas

Os receptores para cininas pertencem à mesma família de receptores que apresentam estrutura com sete domínios transmembranais típicos de receptores acoplados à proteínas G (para revisão ver: Prado *et al.*, 2002). Ambos os receptores B₁ e B₂ são acoplados à proteína G (GPCRs) e envolvem mecanismos complexos de efetadores (Figura 2A). Tanto o receptor B₁ como o B₂ para as cininas são geralmente acoplados à proteína do tipo G α q/11 e na maioria das vezes suas ações 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).

Sob ativação, os receptores B₂ iniciam grande número de respostas intracelulares que variam de acordo com o tipo de célula estudada. Dependendo do tecido, a BK induz excitabilidade das membranas neuronais, contração de músculo liso, divisão celular, aumento da permeabilidade vascular e liberação de grande variedade de agentes biologicamente ativos (Goldstein e Wall, 1984; Regoli, 1984; Vincentini e Villereal, 1984; Gaginella e Kachur, 1989; Roberts, 1989). Eventos iniciais após a ligação incluem aumento do Ca²⁺ citosólico, ativação de proteínas G, de adenilatociclases, guanilatociclases e fosfolipases C, D e A₂ (Burch e Axelrod, 1987; Kremer *et al.*, 1988; Voyno Yassenetskaya *et al.*, 1989; Yanaga *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1992; Ricupero *et al.*, 1993; 1997; Lee *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Exton, 2002) (Figura 2A).

As ações sinalizadoras dos receptores B₁ em resposta à [des-Arg⁹]-BK ou à [des-Arg¹⁰]-calidina são muito similares às descritas para os receptores B₂, com respeito à

ativação do ciclo do fosfatidilinositol, liberação de araquidonato, mobilização de Ca^{2+} e indução precoce de um gene *c-fos*. (Cahill *et al.*, 1988, Menke *et al.*, 1994; Jong *et al.*, 1996, Zhou *et al.*, 1999; Schaeffer *et al.*, 2001). De maneira semelhante à BK, a [desArg⁹]-BK também induz a formação de proteínas e divisão celular (Goldstein e Wall, 1984; Beny *et al.*, 1987; Churchill e Ward, 1987; Prat *et al.*, 1999). É importante ressaltar que a [des-Arg¹⁰]-calidina e a [des-Arg⁹]-BK ativam os receptores B₁ com diferentes especificidades, dependendo da espécie animal considerada (Hess *et al.* 1996; Pesquero *et al.*, 1996).

A BK também causa respostas sinalizadoras que estão associadas tipicamente com a ativação de fatores de crescimento. Nessa mesma linha, a BK causa ativação de tirosina fosfatases (Zhao *et al.*, 1993), da Ras-GTPase ativadora de proteína G (Tsai *et al.*, 1989), da Raf-1 (Rizzo *et al.*, 1999), da esfingosinoquinase (Melendez *et al.*, 1998), de Trks (Fleming e Busse, 1997), MEK/MAPKs (Hayne *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001) e das proteínas sinalizadoras JAK/STAT (Tyk2, STAT3) (Ju *et al.*, 2000) (Figura 2B). Vias adicionais envolvendo as MAPKs, ativadas após o estímulo com BK incluem a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos pulmonares (Hayashi *et al.*, 2000), geração de espécies reativas do O₂ em células de músculo liso vascular (Greene *et al.*, 2000). A via das Trks ou dos receptores associadas às mesmas é uma via transducional que desponta como de particular interesse como nos relatos de trans-inativação do receptor do EGF em células A431 (Graness *et al.*, 2000) ou na sensibilização pela BK, da sinalização do EGF em células primárias adrenais cromafins de rato e em linhagens PC12, onde ocorre um “cross-talk” com o receptor da B₂. A BK também causa respostas sinalizadoras que estão

associadas tipicamente com a ativação de fatores de crescimento. Vias adicionais envolvendo as MAPKs, ativadas após o estímulo com BK incluem a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos, formação de micro-domínios de membrana entre receptores (Hur *et al.*, 2004). A estimulação dos receptores B₂ também pode levar à ativação da rota do NF-κB (Figura 2B), levando à indução cruzada da síntese de proteína dos receptores B₁ (Schanstra *et al.*, 1998; Phagoo *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2000). Também os receptores B₂ modulam a ativação do NF-κB e aumento da expressão da COX-2 via a Ras/Raf-1/ERK em células epiteliais humanas A549 (Chen *et al.*, 2004). A BK também induz a síntese de grande número de agentes inflamatórios vasoativos tais como o fator ativador de plaquetas (PAF), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), taquicininas, óxido nítrico e leucotrienos (Regoli e Barabé, 1980; Vane e Botting, 1987; Cahill *et al.*, 1988; Ahluwalia e Perretti, 1999).

Voyno-Yasenetskaya e colaboradores (1989) demonstraram que os receptores B₂ presentes na artéria pulmonar bovina eram insensíveis à toxina *pertussis* e que causavam a ativação da fosfolipase C. O receptor B₂ também pode estar acoplado à uma proteína G sensível à toxina *pertussis* a qual estimula a liberação de ácido araquidônico de estoques lipídicos e leva à produção de PGE₂ (Yanaga *et al.*, 1991; Ricupero *et al.*, 1993). Grande parte do ácido araquidônico liberado em resposta à BK foi atribuído ao aumento na atividade da FLA₂ (Ricupero *et al.*, 1993). A toxina *pertussis* não parece afetar a mobilização de Ca²⁺, entretanto, esta toxina inibe a liberação de ácido araquidônico estimulado pela BK. Assim, a transdução de sinal intracelular após estímulo dos receptores B₂ pela BK pode estar relacionada com a ativação de diferentes subunidades

G α da proteína G. Deste modo, a BK pode estimular a formação de mensageiros intracelulares, incluindo tanto a geração de prostanóides derivados das COX, bem como das lipooxigenases, a ativação da síntese de NO, produção de inositol trifosfato e de diacilglicerol, com conseqüente ativação da PKC, além da ativação de vários canais iônicos (Ricipero *et al.*, 1993; Blaukat, 2003; Gabra *et al.*, 2003, Prado *et al.*, 2002).

1.8. As cininas nas vias aéreas.

Existem várias evidências experimentais demonstrando que nas vias aéreas as cininas exercem importante papel no controle da função bronco-alveolar (Barnes, 1992; Farmer, 1991; Ellis e Fozard, 2002). Além disso, foi demonstrado que a BK produz contração ou relaxamento na traquéia e em brônquio de cobaia ou de camundongo *in vitro*, dependendo da integridade de epitélio. Ambas as ações da BK parecem ser mediadas indiretamente, via liberação de prostanóides e de NO (Bramley *et al.* 1989; Schlemper e Calixto, 1994; 1995; Figini *et al.*, 1996; Van Heuven-Nolsen *et al.*, 1997; Mazzuco *et al.*, 2000). Estudos farmacológicos e moleculares recentes indicam que muitas das ações da BK nas vias aéreas de cobaia parecem ser mediadas pela ativação de receptores B₂ (Proud *et al.*, 1993; Farmer *et al.*, 1998), pois a clonagem dos receptores das cininas não identificou até o momento, a presença de receptores B₁ em cobaias (Farmer *et al.*, 1998), sendo esta espécie um modelo de “knockout” genético natural para estudo dos receptores B₂. Vários estudos farmacológicos em cobaias indicam que os receptores B₂ são expressos nos tecidos desta espécie (Farmer e Burch, 1992; Hall e Morton, 1997). Embora não existam evidências para a existência dos receptores B₁ em cobaias, estudos

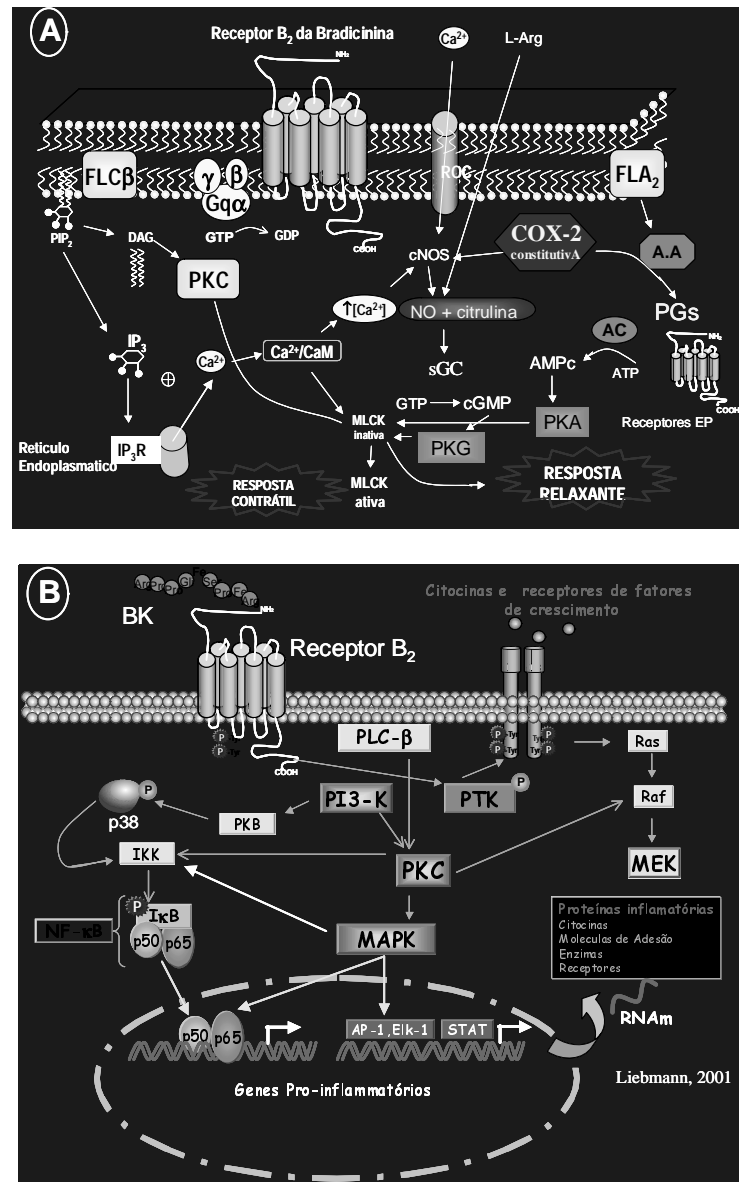


Figura 2 – Vias transducionais usualmente ativadas em resposta à ativação do receptor B₂ pela BK em músculo liso: a fosfolipase C (FLC) gera IP₃, elevando a concentração de Ca²⁺ intracelular, ou diacilglicerol (DAG), que por sua vez ativa a proteína quinase C (PKC). O receptor também pode ativar a via da L-arginina/NO, que ativa a via da guanilato ciclase (GC)/proteína quinase A (PKA). Também ocorre liberação de araquidonato liberar prostaglandina E₂ (PGE₂) é ativada a via da adenilato ciclase (AC)/AMPc (A). Sinalização de quinases pela BK: A BK ativa a fosfatidilinositol-3-quinase (PI₃K), proteínas tirosina quinase (PTk), MEK/MAPKs e das proteínas sinalizadoras JAK/STAT, que translocam para o núcleo, gerando vários fatores de transcrição. Também os receptores B₂ modulam a ativação do NF-κB e aumento da expressão de várias proteínas. Adaptado de Liebmann (2001)

farmacológicos realizados em tecidos das vias aéreas desta espécie, sugeriram outro subtipo de receptor para a BK, chamado receptor “B₃” (Farmer *et al.*, 1989; 1991; Pyne e Pyne, 1993; Farmer e DeSiato, 1994). A existência dos receptores B₃, entretanto é controversa (Trifilieff *et al.*, 1991; Field *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 1995; Scherrer *et al.*, 1995). Evidências sobre a existência dos receptores B₃, bem como uma natureza não usual de receptores B₂ para a BK, comparados com os receptores de outras espécies foram revisados extensivamente por Hall e Morton (1997). Farmer *et al.* (1998) demonstraram pela primeira vez a clonagem, o sequenciamento e a expressão funcional do receptor B₂ a partir de tecido das vias aéreas de cobaia. Este receptor apresentou grande homologia com os receptores B₂ humanos, de camundongo e de coelho. Além disso, em experimentos de competição com ligantes no receptor clonado na cobaia foram obtidos evidências consistentes de que este é um subtipo de receptor B₂ (Farmer e Burch, 1992; Hall e Morton, 1997). Estudos da organização genômica dos receptores B₂ foram realizados em humanos, ratos e camundongos e não confirmaram a existência de mais de um gene do receptor B₂ dentro de uma mesma espécie ou de outras espécies (Hess, 1997; Pesquero *et al.*, 1994; 1996).

1.8.1. Função do epitélio e participação dos EpDRFs

Nas vias aéreas no seu estado normal, o epitélio brônquico forma uma barreira que previne a entrada de substâncias nocivas. Além disso, as células epiteliais brônquicas liberam fatores relaxantes e mediadores broncoconstrictores. Na asma, por exemplo, a perda da função de barreira pode resultar em hiper-reatividade e pode estimular o

potencial inflamatório das células epiteliais. Este mesmo epitélio modula a ação de drogas sobre o músculo liso respiratório, liberando prostanóides (ex: PGE₂) (Braunstein *et al.*, 1988; Folkerts *et al.*, 1989; Raeburn, 1990) e o fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF) (Flavahan *et al.*, 1985; Vanhoutte, 1988; Goldie *et al.*, 1990; Fedan e Frazer, 1992). Existem diversas evidências sugerindo a liberação de EpDRFs das células epiteliais das vias aéreas (Tschirhart e Landry, 1986; Ilhan e Sahin, 1986; Hay *et al.*, 1987; Fernandes *et al.*, 1989; Fernandes e Goldie, 1990). Estas substâncias interagem com o músculo liso e diminuem sua reatividade, tem a capacidade de modular a regulação neural excitatória e inibitória do músculo liso (Flavahan *et al.*, 1985; Wesler *et al.*, 1990; Venugopalan *et al.*, 1990) e a resposta das vias aéreas sensibilizadas para desafios alérgicos (Hay *et al.*, 1986; Montano *et al.*, 1988; Fernandes e Goldie, 1991).

A hiper-reatividade das vias aéreas, observada na asma, pode ser acompanhada por dano da mucosa com perda do epitélio e descamação (Laitinen *et al.*, 1985). Esta lesão da mucosa pode contribuir para o aparecimento da hiper-reatividade brônquica pela ruptura da barreira de difusão desempenhada pelo epitélio, por alteração de rotas metabólicas envolvidas no metabolismo de mediadores e pela interferência com a disponibilidade de substâncias que reduzem a reatividade do músculo liso das vias aéreas. Adicionalmente, o epitélio das vias aéreas também metaboliza peptídeos e modula a reatividade do peptídeo intestinal vasoativo (VIP), taquicininas e catecolaminas, além da BK (Frossard *et al.*, 1986; Hay, 1989; Farmer *et al.*, 1989; Fedan e Frazer, 1992)

1.8.2 . O papel da COX nas vias aéreas

As COXs são as enzimas limitantes responsáveis pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas ou em tromboxano A₂. Tem sido relatado que a BK é capaz de liberar ácido araquidônico, através de aumento no cálcio citosólico e da ativação da FLA₂, aumentando conseqüentemente, a produção de prostanóides nas vias aéreas (Tanaka *et al.*, 1995; Pyne *et al.*, 1997). Além disso, os prostanóides podem estar envolvidos na broncoconstrição induzida pela BK, uma vez que inibidores da COX, tais como a indometacina, previnem significativamente a broncoconstrição causada por este peptídeo (Ichinose *et al.*, 1990). São conhecidas duas isoformas de COX que modulam a produção de prostanóides. A COX-1 produz níveis fisiológicos de prostanóides e é constitutivamente expressa sob condições normais em muitos tecidos. Curiosamente, a expressão da COX-1 não foi detectada na traquéia de cobaia (Charette *et al.*, 1995). A COX-2, a isoforma induzível da enzima, é ativada em muitos tecidos e células após a estimulação com mediadores pró-inflamatórios, tais como endotoxinas bacterianas e citocinas. Charette e colaboradores (1995) usando estratégias farmacológicas e técnica de *western blot*, demonstraram que a liberação de prostanóides da TC+E pela BK é dependente da atividade da COX-2, presente nesse tecido de forma constitutiva. A inibição do tônus intrínseco causado por inibidores de COX nesta preparação, revela que a enzima COX-2 constitutiva tem importante papel regulatório sobre o mesmo, apesar da baixa seletividade dos inibidores de COX-2 utilizados no estudo (Charette *et al.*, 1995). Novos inibidores seletivos da COX-1 e da COX-2 foram sintetizados após estas abordagens (Bhattacharya *et al.*, 1995; Riendeau *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Além disso,

estudos da contração induzida pela BK na TC-E, indicaram o envolvimento dos receptores B₂ com a liberação de cálcio (Ca²⁺) de fontes intracelulares, sendo sensível à rianodina, e possivelmente associada com a ativação de um mecanismo que envolve ativação da proteína quinase C (Calixto, 1995).

Várias evidências sugerem, no entanto, que a indução e a regulação da COX-2 constitui evento fundamental nos processos fisiopatológicos de doenças inflamatórias, como a asma. A indução da COX-2 nas vias aéreas por agentes pró-inflamatórios, como o LPS e a IL-1 β , pode ser observada em células de músculo liso de cão e humano, com o envolvimento das enzimas MAPK p42/44 e da p38 e da via do NF- κ B (Schmidlin *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2003)

1.8.3. A via da L-arginina/NO no aparelho respiratório

No trato respiratório o NO é produzido fisiologicamente por grande variedade de tipos celulares incluindo células epiteliais, nervos, células inflamatórias (ex: macrófagos, neutrófilos, mastócitos) e células endoteliais. Devido às várias localizações nas quais o NO pode ser produzido, sua precisa atividade biológica em algumas partes do aparelho respiratório é difícil de determinar. Isto depende de muitos fatores locais incluindo a atividade das enzimas produtoras de NO, do nível de estresse oxidativo e da taxa de captação de moléculas antioxidantes, tais como a hemoglobina e o co-fator glutationa. (Ricciardolo, 2003). O NO é gerado através da oxidação de cinco elétrons de um terminal nitrogênio guanidina no aminoácido L-arginina, catalisada pelas NOSs. Funcionalmente, as NOSs existem nas formas constitutivas cNOS (eNOS e nNOS) e a forma induzível

iNOS. As cNOS são expressas em células neuronais, epiteliais, endoteliais e em plaquetas. Estas são enzimas Ca^{2+} /calmodulina dependentes e liberam desde pequenas até grandes concentrações de NO após estimulação de receptores como os da acetilcolina ou da BK (Förstermann *et al.*, 1991). A expressão da iNOS foi descrita em macrófagos, neutrófilos, hepatócitos e células epiteliais, mesangiais, endoteliais e de músculo liso vascular. Esta isoforma é regulada em nível pré-translacional e pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)- β (Morris e Billiar., 1994) e libera grandes concentrações de NO pró-inflamatório diversas horas após exposição, podendo continuar de maneira sustentada por horas ou dias. Nas vias aéreas a cNOS é expressa em neurônios (nNOS), células endoteliais (eNOS) e células epiteliais (nNOS e eNOS) (Gaston *et al.*, 1997; Ricciardolo *et al.*, 2000).

O NO, depois de liberado, se difunde rapidamente do local onde foi sintetizado, podendo permear membranas celulares, interage com sítios de moléculas intracelulares dentro de células geradoras e alvos, e tem instabilidade intrínseca, propriedades estas que eliminam a necessidade de receptores extracelulares ou alvos de degradação. O melhor alvo para o NO é a ligação ao ferro no componente heme da guanilato ciclase solúvel, estimulando a conversão de GTP para GMPc e mediando os efeitos biológicos atribuídos ao NO derivado da cNOS como no caso da broncodilatação (Ignarro e Kadowitz., 1985). Além disso, o NO modula outras ações que são independentes da guanilato ciclase e GMPc (Ricciardolo, 2003). Os altos níveis de NO liberado pela iNOS atua como uma molécula efetora imune contra o crescimento de células tumorais, replicação viral e

eliminação de vários patógenos através de um mecanismo que pode envolver inibição da síntese de DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O propósito deste estudo foi investigar, alguns dos mecanismos transduccionais envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes induzidas pela BK na TC+E, comparativamente às da PGE₂. Além disso, foram também estudados para comparação, alguns dos mecanismos envolvidos no relaxamento causado pela prostaglandina E₂ na traquéia de cobaia com epitélio.

2.2. Específicos

- Verificar a importância da participação do epitélio nas respostas da bradicinina na TC.
- Identificar alguns dos eventos transduccionais envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes causadas pela bradicinina na TC.
- Investigar o papel da COX-2, da liberação de PGE₂, bem como o papel da via da L-arginina/NO, na resposta relaxante induzida pela bradicinina na traquéia de cobaia com epitélio.
- Caracterizar o(s) subtipo(s) de receptore(s) prostanóide(s) envolvido(s) nas respostas contráteis e relaxantes induzidas pela bradicinina na TC.
- Investigar alterações funcionais causadas pela bradicinina com a expressão da COX-2, eNOS e nNOS na TC.

- Identificar a seqüência de eventos intracelulares disparados após ativação do receptor B₂ pela bradicinina nas vias aéreas da cobaia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados cobaias machos e fêmeas pesando entre 300 a 400 g (3 e 4 meses de idade). Os animais foram mantidos em isoladores com umidade (60-80 %) e temperatura controladas (22 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro de 12 h (luz após as 7:00 h) e com livre acesso à água e ração balanceada para cobaias até pelo menos 2 h antes dos experimentos.

Antes do início dos experimentos, os animais foram aclimatados no laboratório por pelo menos 1 hora antes do sacrifício. Todos os procedimentos de manipulação, de anestesia e de cirurgia usados no presente estudo foram conduzidos de acordo com as normas de experimentação e vivisseção animal, recomendadas pela Associação Americana para a Ciência de Animais de Laboratório (Trowning Manual Series) (Stark e Ostrow, 1991), e que visam a redução ao mínimo, do sofrimento dos animais. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (262/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina de nº 23080.035334/2003-16/UFSC.

3.2. Experimentos Funcionais

3.2.1. Isolamento e Montagem das Preparações

As cobaias foram sacrificadas após administração de altas doses (100 mg/Kg, i.p) de pentobarbital sódico seguido de deslocamento cervical. As traquéias foram

rapidamente removidas e cuidadosamente dissecadas dos tecidos aderentes. Segmentos com 3 anéis de cartilagem foram abertos (8-10 mm de comprimento) e suspensos em cubas individuais de órgão isolado, contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, mantida a 37° C, pH 7,2, e constantemente borbulhada com mistura carbogênica (5% de CO₂ em 95% de O₂), com a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,1, KH₂PO₄ 1,1 e glicose 11. As preparações foram submetidas a um período de equilíbrio de pelo menos 120 min, sob tensão de 1 g, antes da adição das drogas, tempo durante o qual a solução do banho foi renovada a cada 15 min. As alterações da tensão isométrica foram registradas através de transdutores F-60 (Narco Biosystems) em polígrafo. Para os experimentos com contração à BK, as preparações tiveram a camada epitelial da mucosa removida por suave esfregaço com cotonete embebido em solução nutritiva. A destruição completa do epitélio foi confirmada pela ausência de relaxamento das preparações em resposta à BK (100 nM). Para os experimentos de relaxamento, a integridade do epitélio foi confirmada pelo próprio efeito relaxante induzido pela BK (100 nM), e o epitélio foi considerado viável quando foram obtidos relaxamentos acima de 80% (no mínimo 250 mg de tensão negativa) em preparações sob tônus espontâneo (Schlemper e Calixto, 1995). Todos os experimentos para a BK foram realizados na presença de captopril (3 µM) para evitar a degradação deste peptídeo pelas cininases presentes nas vias aéreas. Possíveis reduções do tônus basal de 1 g das preparações em resposta aos diferentes inibidores e antagonistas ou mesmo em resposta à estimulação repetida com BK, foram corrigidas com adição gradativa de baixas concentrações de carbacol (0,01 a 0,1 nM) ao banho.

3.2.2. Análise do efeito contrátil em preparações sem epitélio

3.2.2.1. Efeito contrátil da BK na traquéia de cobaia sem epitélio

Decorrido o período de equilíbrio de 60 min, as preparações foram contraídas com solução rica em potássio (feita pela substituição equimolar de NaCl por 80 mM de KCl no meio) para verificar a viabilidade dos tecidos. Após a substituição com meio nutritivo normal e relaxamento completo das preparações após sucessivas lavagens, curvas concentração-resposta contráteis do tipo cumulativas foram obtidas para a BK e PGE₂. Estas curvas para os agonistas foram obtidas pelo aumento do agonista através de incrementos de 0,5 log. Para evitar o processo de dessensibilização, somente uma curva concentração-resposta completa foi obtida para cada agonista na mesma preparação. As respostas para a BK foram obtidas na presença de captopril (3 µM) para evitar degradação pela cininase II.

3.2.2.2. Influência de diferentes classes de drogas que interferem sobre a cascata do ácido araquidônico sobre a contração induzida pela BK

Para investigar os mecanismos transduccionais envolvidos na resposta contrátil da BK na TC-E, após o período de equilíbrio, e a obtenção de pelo menos duas respostas contráteis simples estáveis para a BK (100 nM), as preparações foram incubadas por 30 min com uma das seguintes drogas: valeril salicilato (inibidor preferencial da COX-1, 30 a 300 µM), NS 398 (inibidor preferencial de COX-2, 10 a 300 µM), indometacina (1 a 3 µM) e diclofenaco (0,01 a 3 µM) (inibidores não-seletivos de COX), fenidona (inibidor

não-seletivo de COX e LOX, 10 a 100 μM), furagrelato (potente e seletivo inibidor da síntese de tromboxano, 10 e 30 μM), L-655240 (antagonista dos receptores de tromboxano A_2 , 0,03 μM), LY 171883 (antagonista de receptores de leucotrienos D_4/E_4 , 0,3 μM) ou MK 571 (antagonista de receptores CysLT(1) para leucotrienos, 0,3 μM), cicloheximida (inibidor de síntese protéica, 10 a 100 μM) ou beclometasona (um glicocorticóide sintético do grupo da dexametasona, 10 e 30 μM) e novas curvas à BK (100 nM) foram obtidas na presença das mesmas.

3.2.2.3. Influência de diferentes classes de drogas sobre a desssensibilização induzida pela BK na TC-E

Em outra série de experimentos, após o período de equilíbrio de 60 min, diversas respostas contráteis por adição simples de BK (100 nM) foram obtidas na mesma preparação com intervalos de 30 min entre cada resposta. Usualmente progressiva desssensibilização da resposta contrátil para a BK ocorreu e as preparações foram completamente desssensibilizadas ao final de 4 h. A próxima série de experimentos foi conduzida para investigar alguns dos mecanismos envolvidos na taquifilaxia à BK na TC-E. Para isto, após a obtenção de duas respostas contráteis estáveis para este peptídeo (100 nM), as preparações foram pré-incubadas durante todo o período dos experimentos com uma das seguintes drogas: indometacina (3 nM), diclofenaco (3 nM), N(-nitro-L-arginina (100 μM), NS 398 (10 nM) ou valeril salicilato (30 M) e novas respostas simples para a BK (100 nM) foram obtidas com 30 minutos de intervalo entre curvas. Em todos os

experimentos, para corrigir eventual alteração da responsividade das preparações, ao menos um dos experimentos, obtido do mesmo animal, foi exposto somente ao veículo usado para dissolver a droga e usado como controle paralelo.

3.2.3. Análise da resposta relaxante em preparações com epitélio intacto

3.2.3.1. Comparação do efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E

Decorrido o período de equilíbrio das preparações, curvas concentração-resposta não-cumulativas completas foram obtidas pela adição de concentrações crescentes de BK (0,03 a 300 nM) e de PGE₂ (0,03 a 300 nM), com 20 minutos de intervalo entre as adições dos agonistas.

3.2.3.2. Efeito de inibidores das COX e das NOS sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E

Para avaliar a participação de prostanóides e da síntese de óxido nítrico nas respostas relaxantes causadas pela BK, e eventualmente para a PGE₂, foram obtidas respostas simples à BK (100 nM) e à PGE₂ (300 nM). Após sucessivas lavagens das preparações e o retorno das preparações ao tônus basal, foram incubadas às preparações várias drogas tais como: indometacina (INDO, 1 a 10 nM) e piroxicam (PIR, 0,1 a 10 nM) (inibidores não-seletivos de COX), SC 560 (100 nM, inibidor preferencial da COX-1), DFU (100 a 3000 nM, inibidor seletivo de COX-2), NS 398 (1 a 1000 nM, inibidor preferencial de COX-2), rofecoxibe (ROFE, inibidor seletivo de COX-2, 1 a 30 (M) ou 7-nitroindazol (7-NINA, 0,1 a 10 M, inibidor da síntese de óxido nítrico) e novas curvas

foram obtidas na presença das mesmas. Todas as drogas foram incubadas às preparações pelo menos 30 min antes.

3.2.3.3. Efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E

Em outra série de experimentos, foi investigado o efeito de diferentes inibidores enzimáticos que usualmente interferem nas vias de segundos mensageiros ativadas pela ação da BK. Foram utilizadas as seguintes drogas: ODQ (1, 3 e 10 μ M, inibidor da guanilato ciclase), MDL-12,330 A (10 μ M, inibidor da adenilato ciclase), HA 1004 (inibidor não-seletivo da PKA e PKG, 10 μ M), KT 5720 (1 e 3 μ M, inibidor seletivo da PKA) ou KT 5823 (1 e 3 μ M, inibidor seletivo da PKG), quinacrina (100 μ M) e PACOOF₃ (10 μ M) (ambos inibidores da FLA₂), U73122 (300 nM, inibidor da FLC), estaurosporina (100 nM, inibidor não-seletivo de PKC), GF 109203x (3 μ M, inibidor seletivo de PKC), PDTC (10 μ M, inibidor do NF κ -B), PD 98059 (10 μ M, inibidor da MEK1/2), SB 203580 (10 μ M, inibidor da MAPK p38), wortimanina (300 nM, inibidor seletivo da PI₃K), dexametasona (DEXA, 10 μ M) e beclometasona (BECLO, 10 μ M) (ambos glicorticóides inibidores da cascata do ácido araquidônico e da indução da COX-2), herbimicina A (HERBA, 10 μ M, inibidor de tirosina quinase) e AG 490 (1 a 30 μ M, um inibidor seletivo do EGRF-Trk). Todas as drogas foram incubados 30 min antes de nova adição de BK (100 nM) ou da PGE₂ (300 nM).

3.2.3.4. Efeito de antagonistas dos receptores EP para a PGE₂ sobre o efeito relaxante causado pela BK e pela PGE₂ na TC+E

Para caracterizar o(s) subtipo(s) de receptores EP para a PGE₂ envolvido(s) no relaxamento induzido pela BK na TC+E, após a obtenção de respostas relaxantes estáveis para a BK (100 nM) ou para a PGE₂, as preparações foram incubadas com SC 19220 (10 µM, antagonista seletivo dos receptores EP₁), AH 6809 (10 µM, antagonista dos receptores EP₁/EP₂), ou com L 826266 (30 µM, antagonista seletivo EP₃) ou L 161982 (30 µM, antagonista seletivo dos receptores EP₄). Os antagonistas foram incubados entre 10 e 30 min antes, e novas respostas relaxantes foram obtidas na presença dos mesmos.

3.2.3.5. Efeito de bloqueadores de canais de potássio sobre o efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E

A seguir, foi analisada a participação de canais de potássio e do possível fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF) nas ações relaxantes da BK na TC+E. Após a obtenção de curvas relaxantes estáveis para a BK (100 nM) e para a PGE₂ (300 nM), as preparações foram incubadas durante 30 min com bloqueadores de canais de potássio, como a 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), a apamina (100 nM), a caribdotoxina (100 nM) ou a combinação de ambas, iberiotoxina (100 nM), ou ainda com a ouabaína (10 µM). Todas as drogas foram incubadas com as preparações 30 min antes, e novas respostas relaxantes foram obtidas na presença das mesmas.

3.3. Liberação de PGE₂ em resposta à incubação de BK

A liberação basal e a alteração nos níveis de PGE₂ após a adição de BK (100 nM) foi quantificada através de imunoenensaio enzimático específico (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems Inc., MN, EUA). Foi usado o mesmo protocolo descrito anteriormente para os estudos funcionais de relaxamento e as amostras de solução nutritiva de Krebs-Henseleit foram coletadas diretamente das cubas de órgão isolado, com o auxílio de micro-pipeta (500 µL). As amostras foram obtidas de preparações basais ou após serem estimuladas com BK (100 nM) por 10 min. Quando foram utilizados inibidores enzimáticos, como o NS 398 (100 nM), o SC 560 (100 nM), a aminoguanidina (10 µM) e o tirfostin AG 490 (30 µM), essas drogas permaneceram em contato com os tecidos durante 30 min, enquanto que o antagonista dos receptores das cininas HOE 140 (100 nM) foi incubado 10 min antes da estimulação com BK (100 nM). As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C até o dia dos experimentos (no máximo 2 semanas). Os resultados foram expressos em pg de PGE₂ por mg de tecido.

3.4. Papel das enzimas COX-1 e COX-2, e das NOSs nas respostas relaxantes causadas pela BK na TC

3.4.1. Preparação dos tecidos

Para analisar a expressão das enzimas envolvidas nos mecanismos transduccionais ativados pela BK, as traquéias de cobaia foram incubadas em banho para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit (37 °C) sob tensão basal de 1 g, por cerca de 1 h.

Em outra série de experimentos, para avaliar a participação do epitélio nestas preparações, os tecidos foram montados com ou sem epitélio como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, as preparações foram estimuladas com BK (100 nM) por 10 min na presença de captopril (3 μ M), adicionado ao banho pelo menos 20 min antes. Após o período de incubação com a BK, os tecidos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido. Em outra série de experimentos as preparações traqueais foram obtidas de animais previamente tratados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 50 μ g/Kg, i.v.) 12 h antes, para servir de controle positivo para o aumento da expressão da COX-2.

3.4.2. Extração de proteína para análise de Western blot

Os extratos de proteína foram preparados de acordo com D'Aquisto et al. (1999), com algumas modificações. As traquéias de cobaia foram homogenizadas em tampão HEPES (10 mM) resfriado a 4°C (pH 7,4), contendo 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoreto, 50 mM de NaF, 20 μ g/ml de aprotinina (Trasylol, Bayer), 2 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄), 1,5 μ g/ml de inibidor de tripsina, 7 μ g/ml de pepstatina, 5 μ g/ml de leupeptina e 0,5 mM de ditioneitol. Os homogenatos foram re-homogenizados por mais 15 min na presença de 0,1% de Nonidet P-40, centrifugados a 10000 x g por 30 min e o sobrenadante foi separado como e estocado a -70°C até o uso. A determinação da concentração de proteínas foi realizada através de kit Bio-Rad para determinação de proteínas (Bio-Rad Protein Assay kit, CA, EUA).

3.4.3. *Ensaio de Western blot*

Com o objetivo de verificar possíveis alterações no padrão de expressão de proteínas consideradas importantes nas respostas funcionais da BK na TC+E, após a incubação de BK (100 nM), foi utilizada a técnica de *western blot*. A fração citosólica foi obtida como descrito anteriormente, e submetida à eletroforese em gel desnaturante, SDS-poliacrilamida (10 a 12 %), sendo a seguir transferida para membrana de polivinileno difluoreto (PVDF). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5 %) e, posteriormente incubada com anticorpos murinos específicos para as enzimas COX-1, COX-2 ou iNOS, eNOS e nNOS (Santa Cruz Biotechnology). A visualização das proteínas foi realizada utilizando o anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas pelo kit de detecção de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) em filme radiográfico, segundo recomendação do fabricante (D'Aquisto et al. 1999).

3.5. Drogas

Bradicinina (Península, Belmont, CA, USA), Indometacina, piroxicam, 7-nitroindazole (7-NINA), pirrolidinoditio carbamato (PDTC), dexametasona, beclometasona, quinacrina, apamina, caribdotoxina, iberiotoxina, ouabaína, fenidona, tetrodotoxina, diclofenaco, N^o-nitro-L-arginina, cicloheximida, beclometasona e tabletes de solução tampão fosfato (PBS, concentração: NaCl 137 mmol; KCl 2.7 mmol 10 mmol), 4-aminopiridina, (1-[2-([4-clorofenil]metóxi)-2-(2,4-dicloro-fenil)etil]-1H-imidazol (econazol), 9S-(9a, 10b, 11b, 13a)-2,3,10,11,12,13-Hexahidro-10-metóxi-9-metil-11-(metilamino)-epóxi-1H, 9H-diindol [1,2,3-gh:3', 2', 1'-1m]pirrolo[3,4-j] [1,7]benzodiazonin-1-ona (estauros porina) da SIGMA (St. Louis, MO, USA); 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol (SC 560), 8-cloro-dibenz[b,f][1,4] oxazepina-10(11H)-carboxi-(2-acetil)hidrazida (SC 19220), 6-isopropoxi-9-oxaxanteno-2-carboxílico (AH6809), N-[2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil] metanosulfonamida (NS 398) da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI-USA); 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) fenil-2(5H) furanona (DFU), 4-(4'-metilsulfonilfenil)-3-fenil-2-(5H)-furanona (rofecoxibe), L-826266 e L-161982, gentilmente cedidas pela Merck Froost, (Canadá); 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinolaxin-1-ona (ODQ), 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona (PD98059), 1,1,1,-trifluoro-2-heptadecanona (PACOCF₃), 1-[6-[[17b)-3-Metoxiestra-1,3,5 (10)-trien-17-yl]amino]hexil]-1H-pirrole-2,5-dione (U73122), 2-[1-(3-Dimetilaminopropil) indol-3-il]-3-(indol-3-il)maleimida (GF 109203x), (E)-2-ciano-3-(3,4-dihidrofenil)-N-(fenil-metil)-2-propenamida (AG 490), (1S, 6br, 9aS, 11R, 11bR) 11-acetiloxi)-1,6b, 7, 8, 9a, 10, 11, 11b-octahidro-1-

(metoximetil)9a, 11b-dimetil-3*H*-furo(4,3,2-de]indeno[4,5,-h]-2-h]-2-benzopira-no-3,6,9-triona (wortimanina), 4-[5-(Fluorofenil)-2-[4-(metilsul fonil)fenil]-1*H*-imidazol-4-il]piridina hidrocloreto (SB 203580), da Tocris Cookson Inc. (MO, USA); (9*R*, 10*S*, 12*S*)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1*H*-diindolol [1,2,3-fg: 3', 2', 1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6] benzodia zocina-10-ácido carboxílico, hexil ester (KT 5720) e (9*R*, 10*S*, 12*S*)-2, 3 ,9, 10, 11,12-Hexahidro-10-metoxi-2,9-dimetil-1-oxo-9,12-epoxi-1*H*-diindolol [1,2,,3-fg: 3', 2', 1'-kl] pirrolo[3,4-i][1,6]benzo diazocina-10-ácido carboxílico, metil ester (KT 5823) da Calbiochem (San Diego, CA, USA); *cis*-*N*-(2-fenilciclopentil)-azaciclotridec-1-en-2-amina–ono-hidrocloreto (MDL-12,330A), *N*-(2-Guanidino etil)-5-isoquinolinesulfonamida hidrocloreto (HA 1004) e herbimicina A (antibiótico ansamicina), LY 171883 (Lilly Research Laboratories, Eli Lilly & Co., Ind., USA), L-655,240 (gentilmente cedido pelos Drs. Pedro D'Orléans-Juste e Pierre Sirois, Universidade de Sherbrooke Canadá); L-660,711 (MK-571) e Rofecoxibe (Merck Frosst, Quebec, Canada); NS 398, valeril salicilato e furagrelato (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Além disso, todos os reagentes e sais utilizados eram de alto grau de pureza analítica e de origem Merck.

As soluções estoque foram preparadas em PBS com excessão do valeril salicilato, wortimanina, piroxicam, PD98059, SB 203580, U 73122, GF 109203x e L-826266 e L-161982 dissolvidos em dimetil sulfóxido e, indometacina, dexametasona e beclometasona, AG 490, rofecoxibe, KT 5720, KT 5823, furagrelato, NS 398 e MDL 12330A foram dissolvidas em etanol absoluto 50%, e colocados em tubos plásticos siliconizados, mantidos em congelador a – 18 °C. Todas as outras drogas foram diluídas

em PBS. A concentração final de etanol ou dimetil sulfóxido no banho não excedeu 0.02%, concentração esta que somente com o veículo nas preparações controle não teve efeito nesta preparação.

3.6. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão das médias, exceto para as CE_{50} s ou CI_{50} s (i.e. a concentração do agonista que causa metade da resposta relaxante máxima ou da concentração de antagonista requerida para inibir a resposta do agonista 50% da resposta controle, respectivamente), que são indicadas pelas médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95%. Estes valores foram calculados a partir de curvas concentração-resposta completas, por meio de análise de regressão não-linear. As respostas para os agonistas foram expressas tanto como a porcentagem da resposta máxima causada por 100 nM de nitroprussiato de sódio ou como valor absoluto em mg de tensão. A análise estatística foi feita por meio de teste t não-pareado e complementado por análise de variância (1 via), seguido do teste de multi-comparação de Dunnett ou Newmann Keuls quando apropriado. $P < 0,05$ ou menos foi considerado como indicativo de significância. O pacote estatístico usado foi o Gaph pad prism 4.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de inibidores de COX-1 e -2 sobre a resposta contrátil causada pela BK na TC-E

Os resultados da figura 3 mostram que as respostas contráteis causadas pela BK (100 nM) em segmentos de TC-E foram inibidas de maneira concentração-resposta pela INDO, diclofenaco, fenidona ou NS 398 com valores de CI_{50} s de 0,28 (0,17/0,63) μ M, 0,08 (0,017/0,365) μ M, 46,0 (35,0/61,0) μ M e 0,15 (0,09/0,19) μ M, respectivamente. O AH 6809 também inibiu significativamente, de modo dependente da concentração, a contração induzida pela BK, com CI_{50} de 2,7 (1,3/3,8 μ M). Ao contrário, o valeril salicilato (figura 3A), o furagrelato (figura 4A), o L-655,240 (figura 4B), o LY 171883 (figura 5A) e o MK 571 (figura 5B), bem como a cicloheximida (figura 5B), não afetaram significativamente a contração induzida pela BK na TC-E. A beclometasona inibiu apenas levemente esta resposta contrátil à BK (figura 5A).

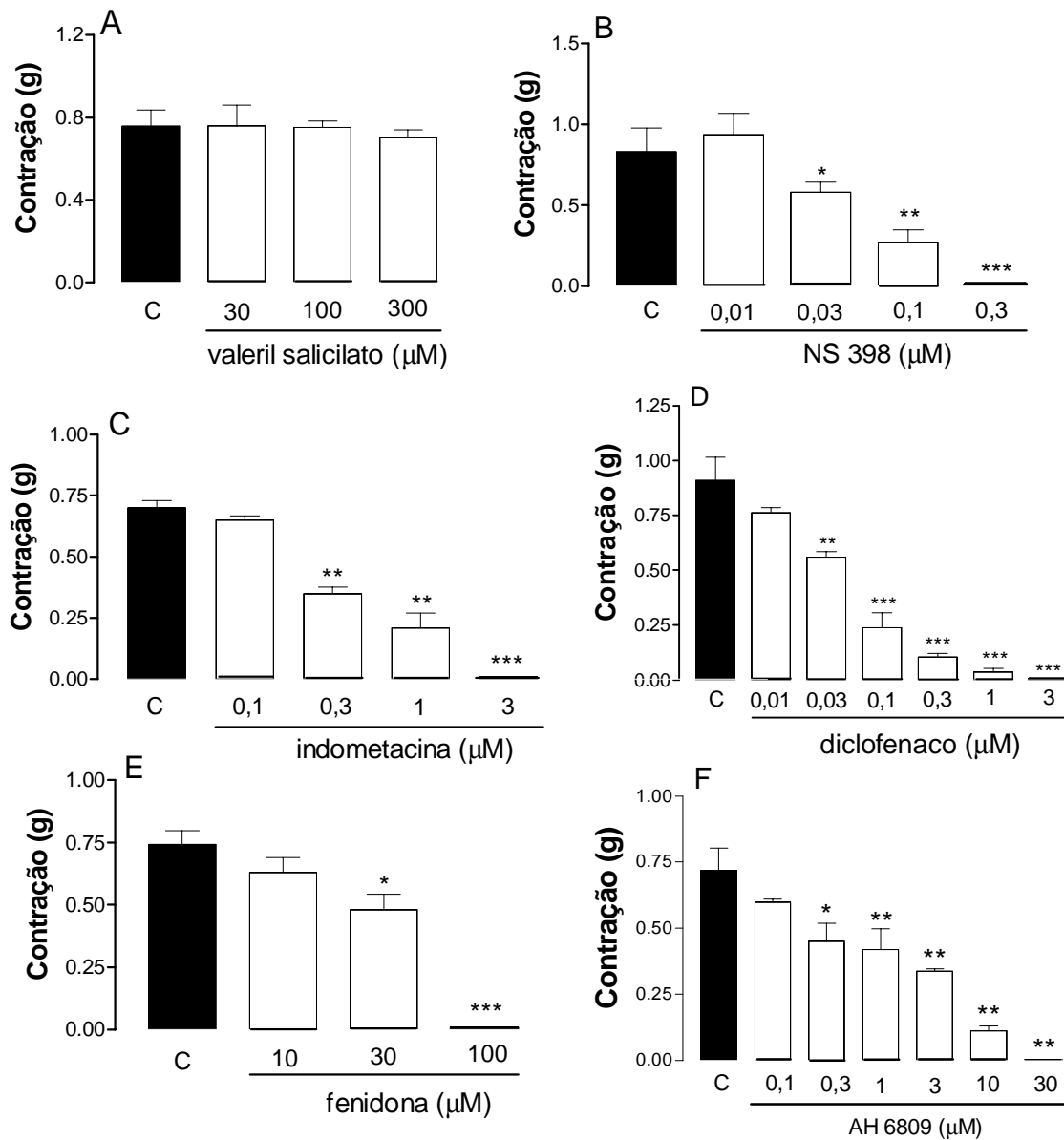


Figura 3 – Efeito do valeril salicilato (A), NS 398 (B) indometacina (C), diclofenaco (D), fenidona (E) ou AH 6809 (F) sobre a contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Cada coluna representa a média de 5-7 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ Significativamente diferente do grupo controle. Teste ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Dunnett.

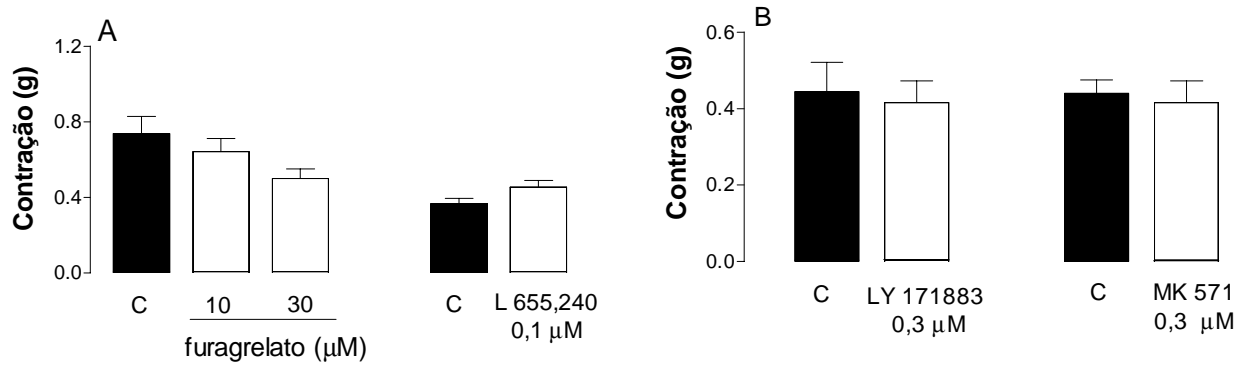


Figura 4 - Efeito do furagrelato e L-655,240 (A) e do LY 171883 398 e MK 571 (B), sobre a contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Cada coluna representa a média de 6-7 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

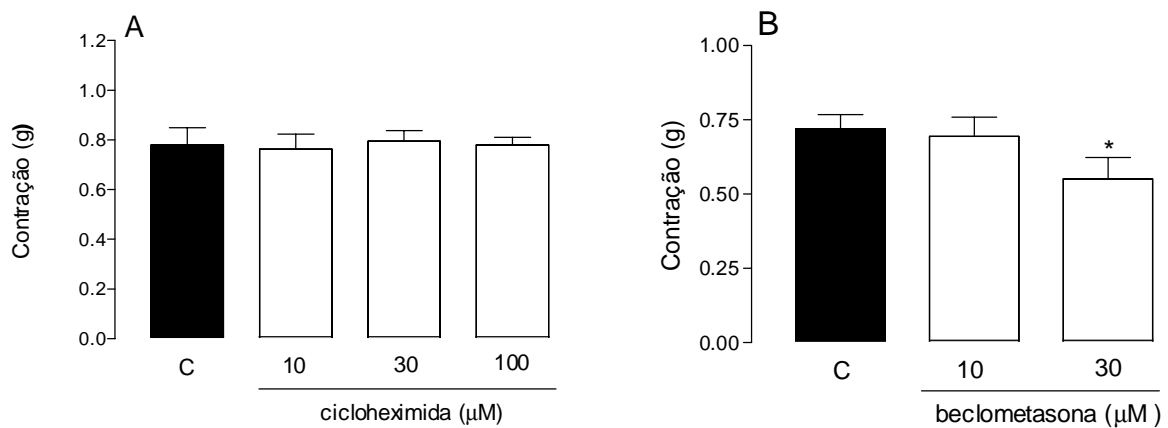


Figura 5 - Efeito da cicloheximida (A) ou da beclometasona (B), sobre a contração induzida pela BK(100 nM) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio. Cada coluna representa a média de 6-7 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$: Significativamente diferente do grupo controle. Teste ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

4.2. Efeito de inibidores de COX-2 e da NOS sobre a dessensibilização da resposta contrátil induzida pela BK na TC-E

A adição de uma concentrações sucessivas simples de BK (100 nM) na TC-E, produziu em cerca de $73 \pm 3\%$ das preparações estudadas, taquifilaxia progressiva e tempo-dependente, quando os experimentos foram conduzidos com intervalos de 30 minutos entre cada curva. Quando as preparações foram incubadas na presença de baixas concentrações de INDO (3 nM), diclofenaco (3 nM) ou NS 398 (10 nM), houve inibição significativa da taquifilaxia observada em todo o período analisado (1,5 a 3,5 h). Ao contrário, o valeril salicilato (30 μ M), reduziu significativamente o processo de dessensibilização somente nos tempos de 1,5 e 2 h do estímulo com BK (figura 6 A).

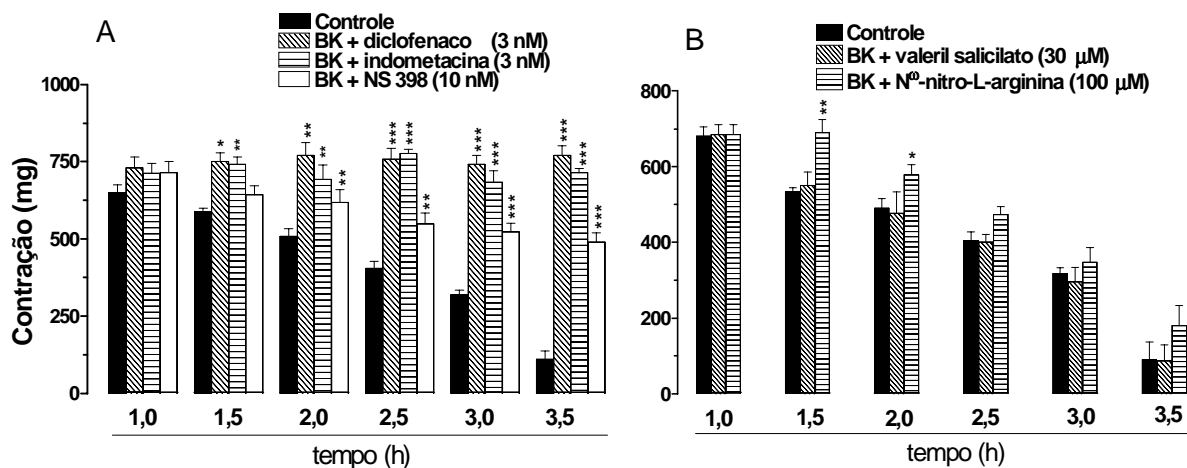


Figura 6 - Dessensibilização tempo-dependente induzida pela BK (100 nM) na TC-E na ausência ou na presença de indometacina, diclofenaco ou NS 398 (A), valeril salicilato or N^o-nitro-L-arginina (B). As colunas representam a média de 5-6 experimentos obtidos de pelo menos 3 animais, e as linhas verticais indicam os E.P.M. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Dunnett.

4.3. Efeito relaxante da BK e da PGE₂ na TC+E

A adição repetida de uma mesma concentração simples de BK (100 nM) ou de PGE₂ (300 nM) com intervalo de 30 min entre cada curva por um período de 1 a 5 h, causou uma pronunciada resposta relaxante da TC+E, resposta esta que apresenta um aumento marcante em função do tempo, tanto para a BK quanto para a PGE₂. Os relaxamentos induzidos por estes dois agonistas nas preparações com alto tônus foram reproduzíveis, sem evidência de taquifilaxia ou dessensibilização (Figura 7A e 7B). Quando da adição de concentrações não-cumulativas de BK (0,03 a 300 nM) ou de PGE₂ (0,03 a 300 nM) no banho produziu uma pequena contração transitória, seguida por relaxamento concentração-dependente de desenvolvimento lento. As CE_{50s} (acompanhadas de seus limites de confiança a 95 %) para esses efeitos foram de 3,2 (2,7/3,4) nM e 18,8 (12,4/21) nM (Figura 7C), e relaxamentos máximos de 387 ± 23,5 e 348 ± 33 mg de tensão, respectivamente. Entretanto, cerca de 45 % das preparações não apresentaram resposta relaxante para ambos os agonistas, inclusive estas preparações respondendo com contração, possivelmente devido a problemas relacionados à variações de sazonalidade ou respostas alérgicas comuns em cobaias (Lane-Petter e Pearson, 1971), que interferem diretamente sobre as vias aéreas e que induzem hiperreatividade nos animais em experimentação. Além disso, preparações que não responderam à BK, invariavelmente também não apresentaram resposta relaxante para a PGE₂ e vice-versa (resultados não apresentados). A associação de concentrações sublimiares de BK (0,01 nM) junto à uma baixa concentração de PGE₂ (0,01 nM) resultou em marcada potencialização da resposta relaxante da BK na TC+E (Figura 7D).

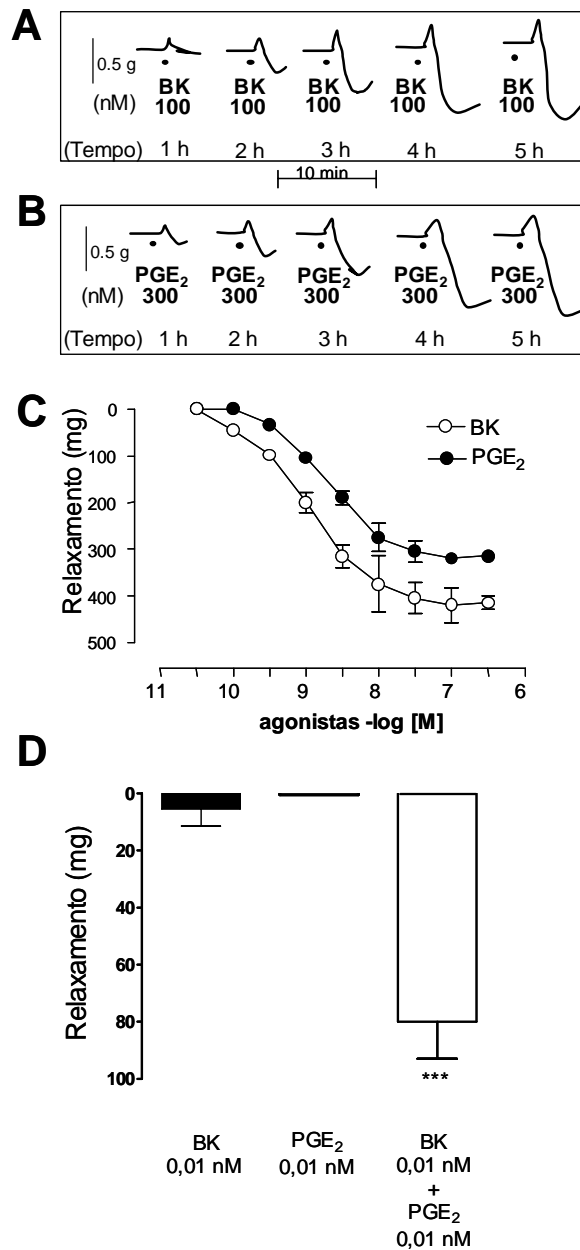


Figura 7 – Registros típicos demonstrando o aumento em função do tempo das respostas relaxantes induzidas pela BK (100 nM) (A) ou pela PGE₂ (300 nM) (B) na TC+E. Curvas concentração-resposta relaxantes completas à BK ou à PGE₂ na TC+E sob tônus espontâneo (C). Efeito relaxante observado com a combinação de concentrações sublimiares de BK (0,01 nM) e de PGE₂ (0,01 nM) na TC+E (D). Cada ponto representa a média de 6-7 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001, significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Dunnett.

4. 4. Efeito de inibidores das COX-1 e da COX -2 e da NOS no relaxamento causado pela BK e PGE₂ na TC+E

A pré-incubação das preparações com os inibidores não-seletivos de COX-1/COX-2, a INDO (0,1 a 3 nM) ou o PIR (0,1 a 3 µM) (Figura 8) ou com inibidores preferenciais da COX-2 DFU (100 a 3000 nM), NS 398 (0,1 a 1000 nM) ou ROFE (1 a 30 µM) (Figura 9), causou inibição concentração-dependente do relaxamento causado pela BK. Além disso, a maioria destas drogas reverteu o relaxamento da BK para uma contração sustentada, de maneira semelhante ao que foi observado quando o epitélio foi removido. As CI₅₀s médias (e limites de confiança de 95 %) para estes efeitos foram de 8,13 (6,1/9,7) nM, 0,27 (0,11/0,42) µM, 0,32 (0,22/0,41) µM, 0,081 (0,061/0,107) µM e 0,34 (0,28/0,55) µM, respectivamente. Quase todos os inibidores da COX não seletivos e os inibidores seletivos de COX-2 testados aboliram a resposta relaxante causada pela BK, transformando essa resposta numa contração sustentada, semelhante àquela da retirada do epitélio traqueal. Entretanto, somente o DFU não foi capaz de reverter o relaxamento para uma contração sustentada. O inibidor preferencial da COX-1, o SC 560, não interferiu com o relaxamento causado pela BK nesta preparação (Figura 6D).

O mesmo efeito foi observado quando as preparações foram incubadas com o inibidor da NOS, o 7-NINA (0,1 a 3 µM), que causou inibição concentração-dependente, porém sem abolir completamente a resposta relaxante da BK (IC₅₀ de 0,4 (0,3/0,6) µM e IM = 83 ± 5,2 %) (Figura 10). Ao contrário, a DEXA, ferramenta farmacológica comumente usada para bloquear a cascata do AA devido à inibição da FLA₂ via aumento

da expressão de lipor cortina, quando incubada ao banho por 30 min, causou aumento significativo da resposta relaxante da BK (100 nM) (ANEXO 3, tabela 3).

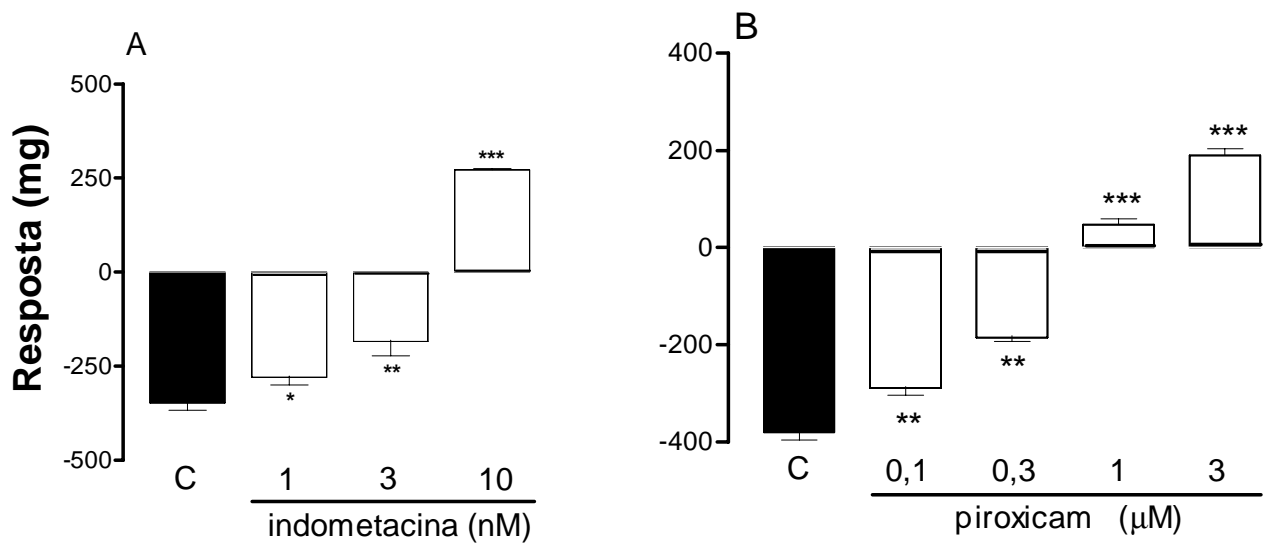


Figura 8 - Efeito dos inibidores não-seletivos da COX, indometacina (A) e piroxicam (B) sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 5-7 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

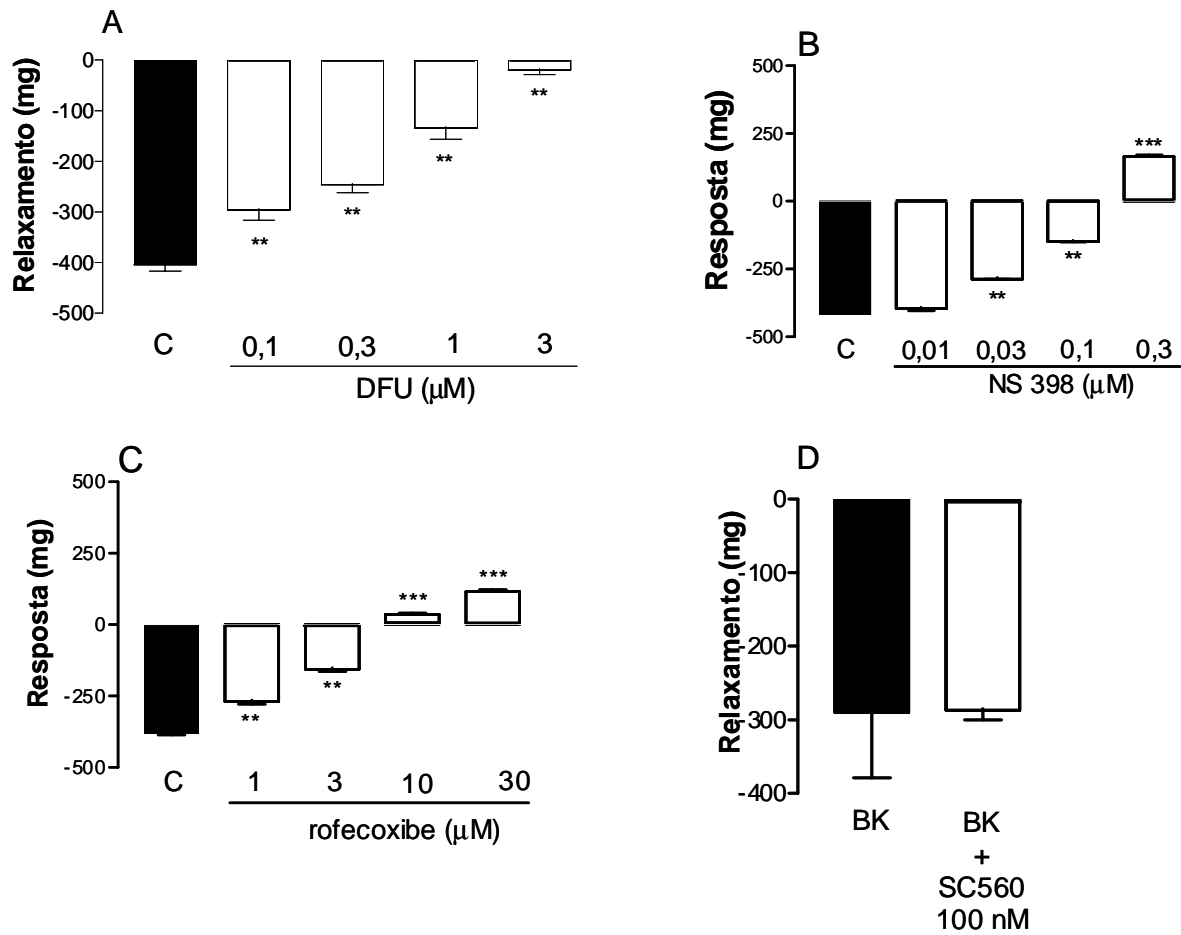


Figura 9 – Efeito dos inibidores seletivos da COX-2, DFU (A), NS 398 (B) e rofecoxibe (C) e do inibidor seletivo da COX-1, o SC 560 (D), sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 5-7 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, ** $P < 0,01$, significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

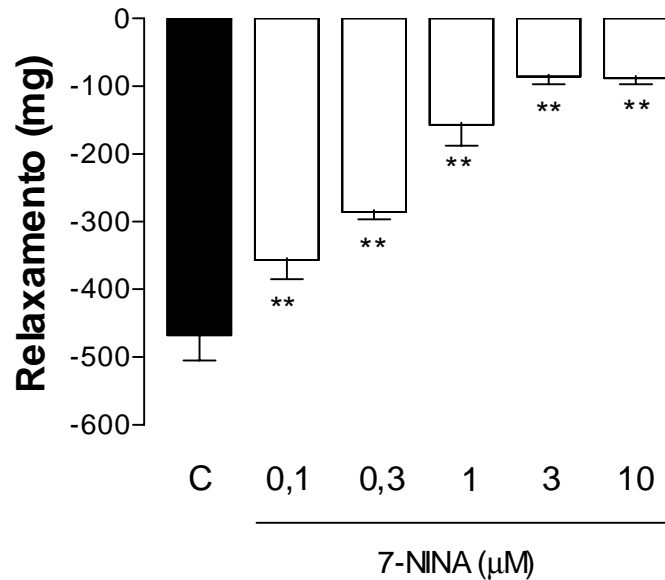


Figura 10 – Efeito inibitório concentração-dependente do inibidor não-seletivo da NOS, 7-NINA no relaxamento induzido pela BK (100 nM) em traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 7-8 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, ** $P < 0,01$, significativamente diferente do grupo controle. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

4.5. Influência de diferentes inibidores enzimáticos e de bloqueadores de canais de potássio sobre a resposta relaxante à BK na TC+E

A incubação das preparações com drogas que reconhecidamente inibem as vias de transdução ativadas pela BK, como o HA 1004 , MDL 12330A , KT 5720 ODQ e KT 5823 (ANEXO 1, tabela 1), quinacrina e PACOOF₃, U73122, estaurosporina, SB 203580 e GF109203x, wortimanina (ANEXO 2, tabela 2), DEXA, BECLO, PDTC e PD 98059 (ANEXO 3, tabela 3), e os inibidores de canais de K⁺, 4-aminopiridina, apamina, caribdotoxina, iberiotoxina, caribdotoxina mais iberiotoxina, não interferem com a

resposta relaxante causada pela BK (100 nM) (ANEXO 4, tabela 4), ou pela PGE₂ (300 nM) (dados não apresentados). Porém, a ouabaína, inibiu significativamente a resposta relaxante à BK (Figura 11).

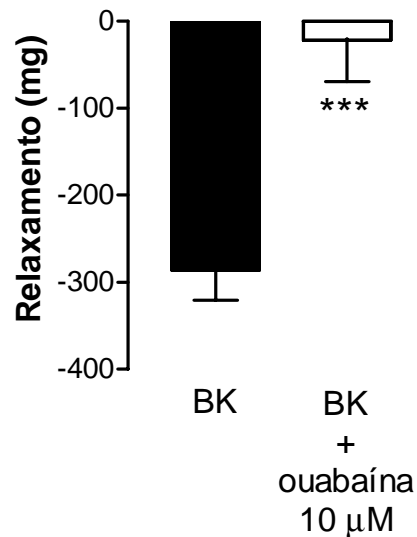


Figura 11 – Efeito da ouabaína sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 9 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, *** P<0,001, significativamente diferente do grupo controle.

4.6. Caracterização do(s) subtipo(s) de receptor(es) EP envolvidos nas respostas relaxantes induzidas pela BK e pela PGE₂ na TC+E.

Tanto as respostas relaxantes causadas pela BK (100 nM) (Fig. 12A), como aquelas causadas pela PGE₂ (300 nM) (Figura 12B), foram inibidas significativamente

pela incubação das preparações com o antagonista dos receptores EP₃, o L 826266 (Figura 12). Porém, os antagonistas seletivos para os receptores EP₁ (SC 19220), EP₁/EP₂ (AH6809) ou EP₄ (L 161982), não interferiram com o relaxamento induzido tanto pela BK como pela PGE₂ na TC+E (Figuras 12A e 12B).

4.7. Influência de inibidores da Trk na resposta relaxante induzida pela BK na TC+E

A resposta relaxante causada pela BK (100 nM), mas não aquela induzida pela PGE₂ (300 nM), foi inibida significativamente pela adição de HERBA (10 µM), revertendo a resposta relaxante para contração sustentada (Figura 13A). Além disso, o inibidor da EGFR-Trk, o AG 490 (1 a 30 µM) (de maneira semelhante à observada para os inibidores de COX-2), inibiu de forma dependente da concentração a resposta relaxante induzida pela BK (100 nM), causando inversão do relaxamento para uma contração sustentada. A CI₅₀ calculada para o AG 490 foi de 13,4 (10,8/21,1) µM (Figura 13B). Da mesma forma que alguns inibidores da COX, os antagonistas dos receptores EP₃ ou EP₄ e os inibidores da Trk também causaram redução importante no tônus das preparações (resultados não apresentados).

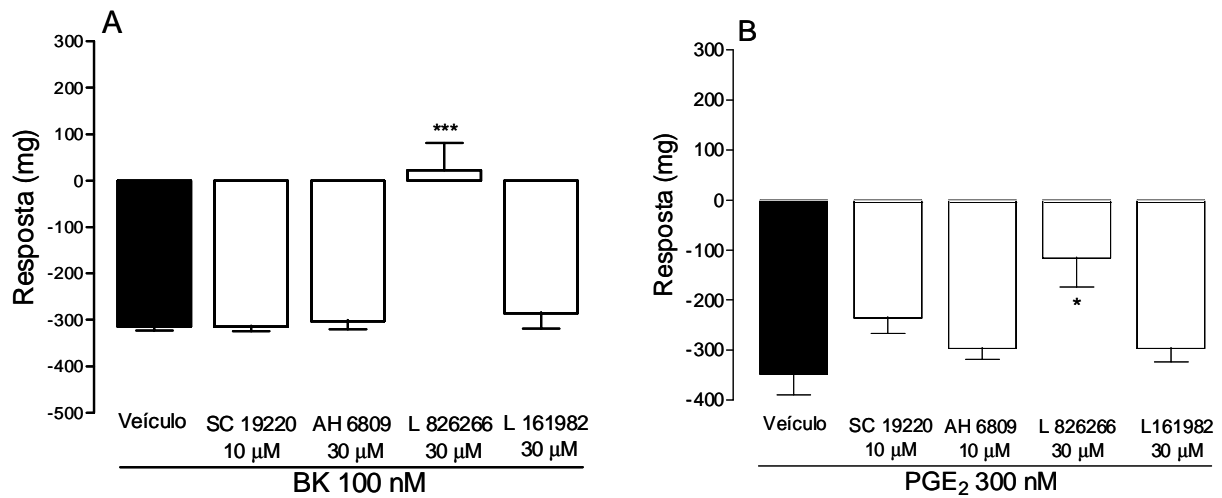


Figura 12 – Efeito dos antagonistas dos receptores EP₁ (SC 19220, 10 μM), EP₁/EP₂ (AH 6809, 10 μM), EP₃ (L 826266, 10 μM) ou EP₄ (L 161982, 10 μM) sobre o relaxamento induzido pela BK (100 nM) (A) ou para a PGE₂ (300 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. Cada coluna representa a média de 7-8 experimentos e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo controle, * P < 0,05, *** P < 0,001.

4.8. Liberação de PGE₂ pela BK na TC+E

Mesmo em condições basais há uma grande produção constitutiva de PGE₂ na TC+E quando mantida em banho de órgão isolado. Quando as preparações foram estimuladas com BK (100 nM) por 10 min, houve aumento significativo na liberação de PGE₂ para o meio contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (Figura 14). Para avaliar que subtipo de receptor da BK estaria envolvido neste efeito, o papel dos prostanóides, bem como a isoforma de COX responsável por essa resposta, foram utilizados inibidores seletivos da COX-1, o SC 560 (10 nM) e da COX-2, o NS 398 (100 nM), ou ainda do antagonista seletivo dos receptores B₂, o HOE 140. O aumento da concentração de PGE₂

causado pela adição de BK no banho foi inibido significativamente pelo NS 398 ($82,5 \pm 3,8 \%$), pelo antagonista

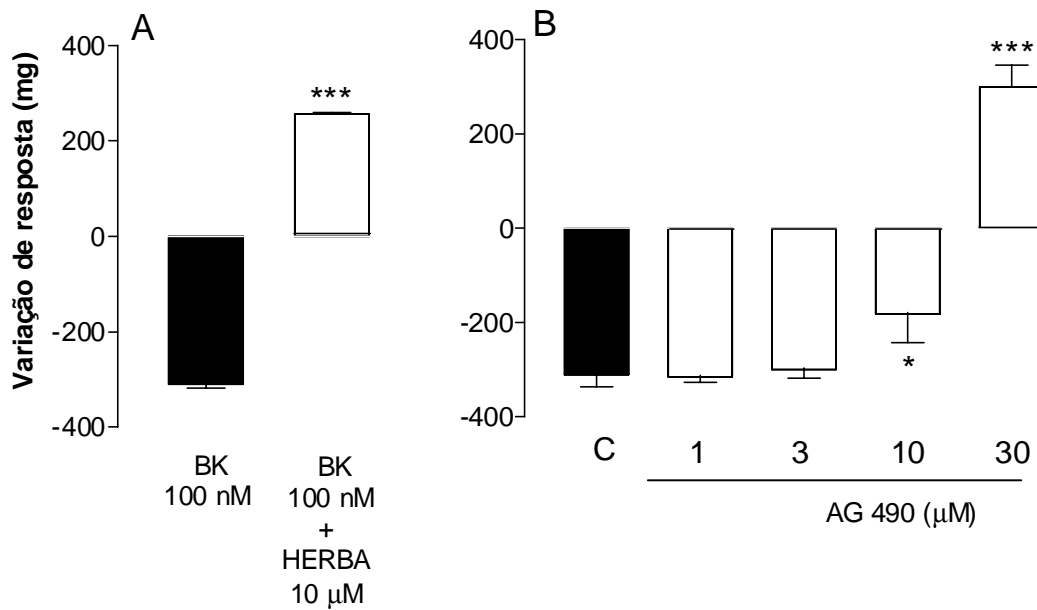


Figura 13 – Efeito relaxante da BK (100 nM) na ausência ou na presença de herbimicina A (HERBA) (A) e tirfostin AG 490 (B) na TC+E. Cada coluna representa a média de 8 - 9 determinações de experimentos individuais e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo bradicinina, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, significativamente diferente do grupo controle (C). ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

dos receptores B_2 o HOE 140 ($83,75 \pm 9,4 \%$) e pelo tirfostin AG 490 ($95,2 \pm 3,6 \%$) (Figura 14). Estes resultados sugerem que a PGE_2 parece ser produto derivado da atividade da COX-2, liberado pela BK via ativação dos receptores B_2 das cininas, com uma possível ativação de uma EGF-Trk. Além disso, o inibidor da NOS, a

aminoguanidina (10 μ M) e o inibidor da COX-1, o SC 560 (10 nM) não tiveram nenhum efeito significativo sobre a liberação de PGE₂ causado pela adição de BK nas preparações (Figura 14).

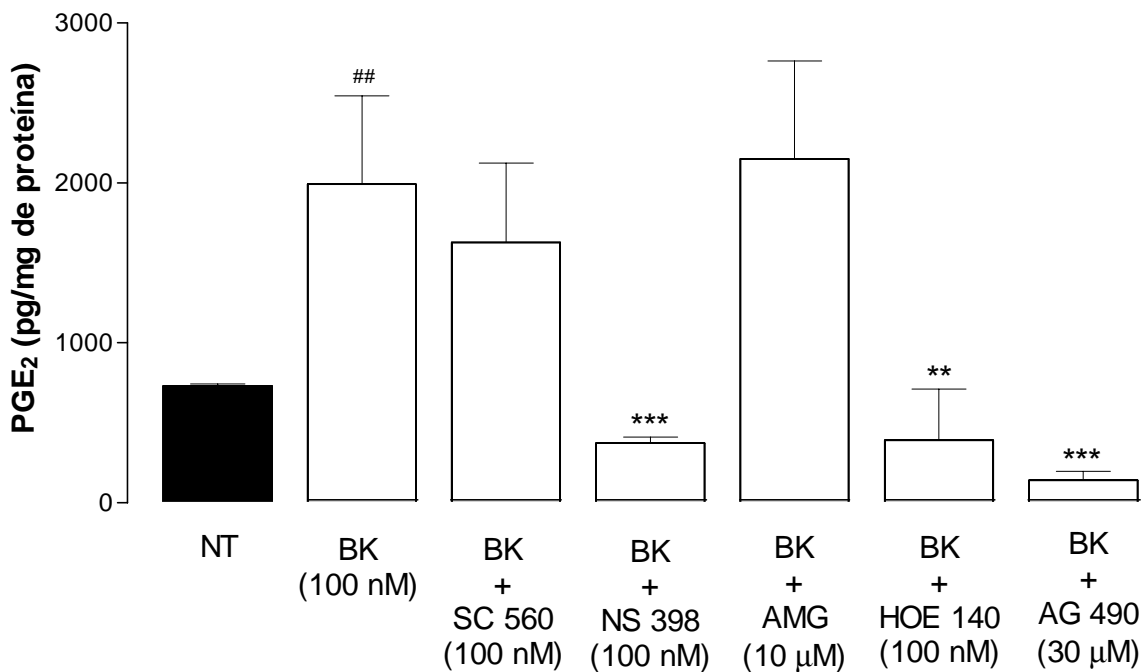
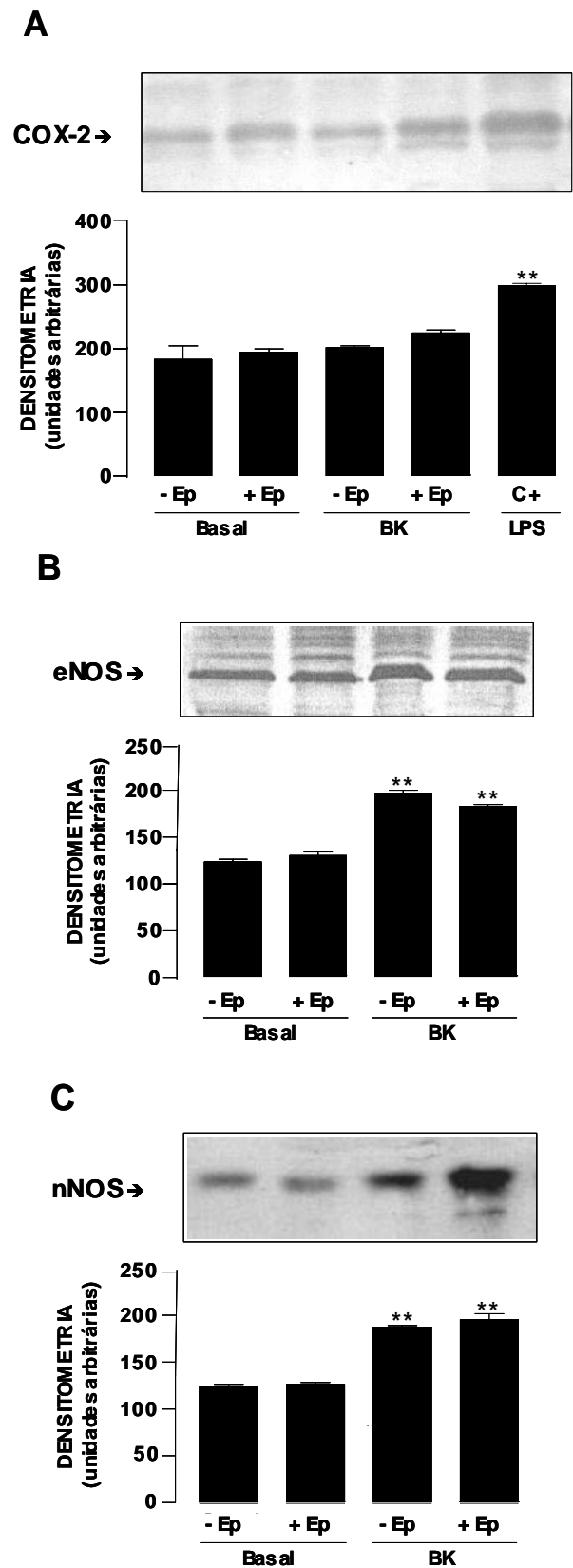


Figura 14 - Efeito de inibidores da COX-1 (SC 560), da COX-2 (NS 398), da síntese de óxido nítrico (aminoguanidina, AMG), da tirosina quinase relacionada ao receptor do fator de crescimento epidermal (tirfostin AG 490, 30 μ M) ou do antagonista seletivo do receptor B₂ (HOE 140) sobre a geração de PGE₂ induzida pela BK (100 nM) na traquéia de cobaia com epitélio. As concentrações de PGE₂ foram quantificadas por ELISA como descrito em Material e Métodos. Cada coluna representa a média de 3 experimentos individuais e as linhas verticais indicam os erros-padrão das médias. Difere significativamente em relação ao grupo bradicinina, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Difere significativamente em relação ao grupo não tratado (NT), ## P < 0,01 ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.

4.9. Efeito da BK sobre a expressão protéica das enzimas COX-1, COX-2, eNOS, nNOS e iNOS na TC

A Figura 15 representa os resultados obtidos quando foram avaliadas as possíveis alterações causadas pela BK na expressão das proteínas COX-1, COX-2, eNOS, nNOS e iNOS na TC. É importante ressaltar que a COX-2, a nNOS e a eNOS estão constitutivamente expressas de modo semelhante, tanto nas preparações com e sem epitélio (Figura 15). A estimulação das preparações com BK (100 nM) por 10 min não foi capaz de interferir no padrão de expressão protéica da COX-2 (Figura 15A). No entanto, nas TC+E de animais tratados com LPS (50 µg/kg, via i.v., 12 h antes) houve aumento na expressão da COX-2. Já a adição de BK (100 nM) às preparações causou aumento na expressão das enzimas nNOS ($38,3 \pm 11,3$ %) (Figura 15B) e eNOS ($33,2 \pm 8,9$ %) (Figura 15C), independente da presença ou não do epitélio traqueal (Figuras 15B e 15C).

Figura 15 - *Western blot* representativo, mostrando a expressão constitutiva das proteínas da COX-2 (A), da eNOS (B) e da nNOS (C) nas na ausência ou na presença de BK (100 nM), por 10 min, na TC com (+ Ep) ou sem epitélio (- Ep). Os resultados foram normalizados por unidades arbitrárias de densitometria do grupo basal e são expressos como a média \pm E.P.M. (N = 3). Os dados diferem significativamente do valor controle, $**P < 0.01$. Difere significativamente em relação ao grupo não tratado basal. ANOVA de uma via seguido do teste de multicomparação de Newmann Keuls.



5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estendem os relatos existentes na literatura e demonstram que a BK produz resposta contrátil em segmentos de TC-E. Esta resposta contrátil induzida pela BK na TC-E é mediada exclusivamente via a ativação de receptores B₂ (Trifillief *et al.*, 1992; 1993; Schlemper e Calixto, 2000), com ativação da via da COX-2 constitutiva e liberação de prostanóides contracturantes (Charette *et al.*, 1995).

Alguns autores demonstraram recentemente que a BK pode aumentar a expressão da enzima COX-2 e gerar prostanóides (principalmente PGE₂) em células de músculo liso das vias aéreas humanas através da ativação dos receptores B₂ (Pang e Knox, 1997b). Assim, foi inicialmente investigado no presente estudo se os prostanóides derivados das vias da COX-1 e da COX-2 poderiam estar implicadas nas respostas contráteis induzidas pela BK na TC-E. Nossos resultados mostram que inibidores não-seletivos da COX, tais como a indometacina e o diclofenaco e o inibidor seletivo da COX-2 NS 398, inibiram de maneira dependente da concentração a contração induzida pela BK em preparações de TC-E. Por outro lado, o valeril salicilato, um reconhecido inibidor preferencial da COX-1 (Bhattacharya *et al.*, 1995), não modificou a contração induzida pela BK na TC-E. Além disso, o L-655,240 antagonista dos receptores TP do tromboxano A₂ e o furagrelato, um inibidor da síntese de tromboxano A₂ não tiveram efeito significativo sobre a contração induzida pela BK na TC-E, descartando a possibilidade da BK estar liberando este prostanóide ao ativar o receptor B₂. Estes achados claramente sugerem que os

metabólitos da via do AA derivados da COX-2 são os principais prostanóides envolvidos na contração mediada pela BK na TC-E. Também a fenidona, um inibidor não seletivo da COX e da LOX, causou redução gradual destas respostas contráteis causadas pela BK. A participação de leucotrienos derivados da LOX é improvável porque antagonistas de leucotrienos D₄/E₄, o LY 171883 ou o MK 571, não interferiram com a contração induzida pela BK. Charette e colaboradores (1995), utilizando análise farmacológica e de imunoblot, demonstraram que os prostanóides derivados da COX-2 são os principais responsáveis pelo controle do tônus intrínseco na TC-E.

Tem sido relatado que as ações da BK em células musculares lisas das vias aéreas e em segmentos de pulmão são mediadas via ativação de receptores B₂ acoplados à proteínas Go/Gi, um efeito que é sensível à DEXA, cicloheximida ou actinomicina D, o que sugere o envolvimento da síntese *de novo* de proteínas (Paegelow *et al.*, 1995; Pang e Knox, 1997a). O presente estudo demonstra que a contração da BK na TC-E não foi afetada pela cicloheximida e foi somente inibida de forma parcial pela BECLO. Tais resultados são consistentes com a noção de que a síntese *de novo* de proteínas não poderia contribuir para os mecanismos envolvidos na contração da BK na TC-E. Em estudos anteriores verificamos que a histamina, acetilcolina, PAF, tromboxano A₂ e taquicininas, não parecem estar envolvidos na resposta contrátil induzida pela BK, pois seus antagonistas seletivos, em concentrações onde eles normalmente são eficazes no bloqueio de seus receptores específicos, não interferiram com essa resposta. Embora a tetrodotoxina (TTX)

tenha causado inibição de cerca de 16% da contração causada pela BK na TC-E, este efeito parece ser resultante da liberação neuronal de transmissores na resposta contrátil induzida pela BK (resultados não apresentados). Inoue e colaboradores (1992) descreveram que a TTX nas mesmas concentrações utilizadas previne significativamente a contração induzida pela BK no músculo liso de TC, sugerindo o envolvimento de ações neurais pré-sinápticas que teriam influência direta sobre o tônus das preparações.

Um resultado interessante do presente estudo foi a completa inibição da dessensibilização da resposta contrátil causada pela BK na TC-E na presença de baixas concentrações de INDO, diclofenaco ou de NS 398. O inibidor relativamente seletivo de COX-1, o valeril salicilato, em concentração suficiente para inibir a COX-1, não preveniu a dessensibilização induzida pela BK na TC-E. A este respeito tem sido largamente demonstrado que a BK, atuando através de receptores B₂, mas não B₁, induz *in vitro* (Robert e Gullick, 1990; Rangachari *et al.*, 1993; Rueff *et al.*, 1994; Pizard *et al.*, 1999) e *in vivo* (Reynolds *et al.*, 1999; Campos e Calixto, 1995) dessensibilização após exposição aguda ou crônica para o peptídeo. Os mecanismos que determinam essa dessensibilização à BK são muito complexos e até o momento não estão completamente entendidos. Entretanto, este fenômeno parece envolver a interação da afinidade ao receptor ou a ativação tanto de guanilato como de adenilato ciclases, e a conseqüente formação de GMPc e AMPc (McGehee *et al.*, 1992; Reiser *et al.*, 1984; Burgess *et al.*, 1989; Harvey e Burgess, 1993; Rueff *et al.*, 1994; Olmos *et al.*, 1995). De modo semelhante, estudos recentes têm demonstrado

que a dessensibilização e a internalização do receptor B₂ para a BK envolve processos relacionados à presença de resíduos de tirosina e serina na cauda citoplasmática dos receptores (Faussner *et al.*, 1998; 1999). Além disso, há evidências indicando que a dessensibilização dos receptores B₂ é associada com o processo de regulação para cima do receptor B₁, envolvendo mecanismos relacionados com a produção de citocinas inflamatórias. Entretanto, isto não envolve mecanismos que levam à síntese da proteína β-arrestina, pré-requisito básico para a dessensibilização de receptores acoplados à proteína G, mas parece ser parcialmente mediado por cavéolas, processo responsável pela endocitose e internalização desta família de receptores (Phagoo *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2001; Krasel *et al.*, 2005). Estudos adicionais são necessários para clarificar o papel de prostaglandinas nestas respostas na TC-E. Além disso, uma dessensibilização cruzada entre receptores colinérgicos M₃ e os B₂ da BK foi observada em linhagem de neuroblastoma humano, a SH-SY5Y (Willars e Nahorski, 1995). Em outro estudo, Willars *et al.*, (1999) demonstraram que a fosforilação do receptor não contribui para a dessensibilização cruzada entre o carbacol e a BK. Em nosso estudo, foi observada dessensibilização similar entre a resposta funcional contrátil causada pelo carbacol e pela BK na TC-E (resultados não apresentados). Assim, o esclarecimento dos mecanismos relacionados com a resposta dessensibilizante observada para a contração da BK na TC-E merece futuras investigações.

Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que a BK causa relaxamento na TC+E, através da ativação de receptores B₂, com

envolvimento da cascata do ácido araquidônico e da via da L-arginina/NO (Schlemper e Calixto, 1994). Além disso, existem diversos relatos na literatura sugerindo um papel protetor do fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF) nas vias aéreas, o qual seria composto principalmente por PGE₂ e NO (Folkerts e Nijkamp, 1998). Para estender essas evidências, investigamos alguns dos mecanismos transduccionais envolvidos na resposta relaxante para a BK em segmentos de TC+E. A exemplo de outros receptores acoplados à proteína G, os receptores B₂ para as cininas sofrem redistribuição, dessensibilização e endocitose subcelular após ação dos agonistas, tanto em cultura de células, como em outros sistemas. Como comentado anteriormente, após estimulação pelo agonista dos receptores B₂ são internalizados, um processo que envolve mecanismo de redistribuição para cavéolas e a formação de vesículas recobertas via não-clatrina (De Weerd e Leeb-Lundberg, 1997; Haasemann *et al.*, 1998). Um fato interessante no modelo funcional com músculo liso traqueal de cobaia é que não foi observada dessensibilização para o efeito relaxante induzido pela BK na TC+E. Pelo contrário, foi observado aumento desta resposta em função do tempo. Esta discrepância fisiológica permanece a ser investigado em estudos futuros.

Está atualmente bem estabelecido que a BK é um potente liberador de prostaglandinas (Regoli e Barabé, 1980; Farmer e Burch, 1991; Farmer, 1992). A BK é reconhecida como um mediador que ativa a cascata do ácido araquidônico, com conseqüente produção de PGE₂ em linhagens de células pulmonares humanas A549 (Saunders *et al.*, 1999; Tokumoto *et al.*, 1994), bem como em cultura primária

de células de músculo liso das vias aéreas de tecido humano (Pang e Knox, 1997b), bovino (Delamere *et al.*, 1994) e de cobaia (Farmer *et al.*, 1991). Uma vez que a PGE₂ causa resposta relaxante muito semelhante àquela produzida pela BK, esse prostanóide poderia ser um dos responsáveis pela modulação da resposta relaxante observada para a BK neste tecido. Quando uma baixa concentração (0,01 nM) de PGE₂, que não é capaz por si só de causar relaxamento significativo na TC+E, foi incubada nas preparações em associação com baixa concentração de BK (0,01 nM), houve potencialização do efeito relaxante para este peptídeo. Além disso, nossos resultados confirmam e estendem essas observações, bem como demonstram que ocorre grande produção de PGE₂ após adição de BK na TC+E, apesar deste tecido já apresentar altos níveis basais deste prostanóide, produto de uma isoforma constitutiva da enzima COX-2 (Charette *et al.*, 1995).

A liberação de AA é o principal evento responsável pela produção de prostanóides. Vários relatos da literatura mostram que a BK causa ativação da FLA₂ citosólica (cFLA₂) de 85 kDa, liberada via aumento do Ca²⁺ citosólico livre. A cFLA₂ libera AA dos fosfolípidos da membrana celular e promove ativação da COX. Esta última converte o AA para o intermediário endoperóxido PGH₂ que, por sua vez, é convertido por outras sintases intermediárias para prostaglandinas (Tanaka *et al.*, 1995). Resultados anteriores obtidos em células primárias de músculo liso de traquéia de cobaia mostraram que a incubação com BK por 10 min estimula a síntese de cAMP (Pyne *et al.*, 1997). A via reguladora da síntese de cAMP após a estimulação pela BK para este receptor poderia envolver: (1) ativação da MAPK

dependente de PKC, (2) fosforilação da MAPK e ativação de cFLA₂ e, (3) utilização de AA derivado da cFLA₂ e a via da COX produzindo PGE₂ que, por sua vez, atua como substância autócrina através da ativação de um receptor acoplado a uma proteína G_s, que estimularia a formação de cAMP intracelular. Os autores demonstraram ainda que as vias sinalizadoras das MAPK e da FLA₂ foram ativadas, fato demonstrado pelo uso de PD 98059 (inibidor da ativação da MAPK quinase-1 (MEK-1), AACOCF₃ (inibidor de cFLA₂) e indometacina (inibidor da COX).

Quando células primárias de músculo liso do brônquio humano foram estimuladas com IL-1 β , foi observado rápida geração de PGE₂. Esta liberação é bloqueada pelo inibidor seletivo da COX-2, o NS 398, bem como pelo inibidor seletivo de cFLA₂, o AACOCF₃ (Schmidlin *et al.*, 2000). Além disso, a pré-incubação das células com SB 203580 (inibidor da MAP kinase p38) reduziu a fosforilação da cFLA₂ para um nível abaixo daquele observado em células controle, prevenindo a síntese de PGE₂ (Schmidlin *et al.*, 2000). Ferramentas farmacológicas semelhantes foram usadas em nosso estudo e não foi possível observar o envolvimento das MAPK ou a da ativação da FLA₂ no relaxamento induzido pela BK na traquéia de cobaia, uma vez que o PD 98059, o SB 203580, o PACOCF₃ e a quinacrina, não interferiram significativamente com a resposta relaxante à BK. Por outro lado, foram obtidos resultados paradoxais em nossos estudos, onde drogas com ações antiinflamatórias reconhecidas, como a dexametasona e a beclometasona, drogas capazes de inibir a COX-2 e outros sistemas enzimáticos induzíveis

(incluindo a ativação da FLA₂ e de toda a cascata do ácido araquidônico) potencializaram o efeito relaxante da BK na TC+E *in vitro*. Recentemente, foi descrito que em células musculares de traquéia de cobaia em cultura estimuladas pela BK, os glicocorticóides aumentaram a transcrição do gene do receptor B₂ (Scherrer *et al.*, 1999). Por outro lado, Schmidlin *et al.* (1998) demonstraram em células de músculo liso bronquial humano, por análise de *northern blot*, que os glicocorticóides foram capazes de inibir a expressão aumentada do mRNA dos receptores B₂ causado pela interleucina-1 β . Neste contexto, já que nem os glicocorticóides, nem os inibidores da FLA₂ interferiram com a resposta relaxante dependente da liberação de prostanóides causada pela BK. A principal dúvida seria: qual é a fonte de AA utilizada para a produção de PGE₂, sem a participação da cFLA₂? Os mecanismos envolvidos precisam ser melhor investigados.

Anteriormente, foi sugerido que as células epiteliais da TC poderiam liberar prostaglandinas relaxantes, tais como a PGE₂ e a prostaciclina (Bramley *et al.*, 1990), bem como substância não relacionada a prostanóides chamada de fator relaxante derivado do epitélio (EpDRF) (Bertrand e Tschirhart, 1993). O epitélio das vias aéreas é uma barreira física que protege nervos sensoriais e o músculo liso da estimulação por substâncias e partículas irritantes inaladas. Além disso, as células epiteliais liberam mediadores (EpDRFs) que podem inibir a broncoconstrição devido o relaxamento do músculo liso, bem como podem contribuir na inflamação das vias aéreas através da produção de mediadores lipídicos e de citocinas pró-inflamatórias (Pang e Knox, 1998; Chung e Barnes, 1999; Rodgers *et al.*, 2002).

Dados funcionais sobre os EpDRFs têm sido fornecidos por experimentos onde diferentes mediadores endógenos induzem o relaxamento das preparações traqueais com epitélio, mas que causam contração em preparações faltando esta camada celular. Recentemente, diversas evidências têm sugerido papel protetor para os EpDRFs nas vias aéreas (Fernandes e Goldie, 1990; Burgaud *et al.*, 1993). Folkerts e Nijkamp (1998) deram especial atenção para a relevância farmacológica dos possíveis EpDRFs, PGE₂ ou NO, na modulação do tônus das vias aéreas sob condições basais em modelos *in vitro* e *in vivo*. Atenção particular também tem sido dada para o papel dos EpDRFs no desenvolvimento de hiper-responsividade em modelos animais e em pacientes com asma. De fato, nosso estudo indicou que a remoção do epitélio da TC preveniu completamente o relaxamento induzido pela BK, alterando a resposta relaxante para uma contração sustentada.

Atualmente houve grande ênfase para a presença de um fator hiperpolarizante em diversos vasos sanguíneos, responsável pelo relaxamento dependente do endotélio e que pode ser parcial ou totalmente resistente aos inibidores da COX e do NO (Jansen, 2002; Busse *et al.*, 2002; Nagao e Vanhoutte, 1992; Féléto e Vanhoutte, 2003). O EDHF pode ser ativado pela BK em alguns vasos (Ohnishi *et al.*, 2001; Batenburg *et al.*, 2004; Nelli *et al.*, 2004). Diversas linhas de evidências sugerem que a hiperpolarização dependente do endotélio resulta da abertura de canais de K⁺ no plasmalema do músculo liso. Assim, os canais de K⁺ poderiam ter um papel chave na regulação do potencial de membrana e excitabilidade celular. Os mais importantes canais de K⁺ presentes no músculo liso, incluindo nas vias aéreas

são os dependentes de ATP (ativados por aumentos na concentração intracelular de ATP), BK_{Ca} (ativados por aumentos nas concentrações de Ca²⁺ intracelular) e Kv (ativado por despolarização (Kotlikoff, 1993; Nielsen-Kudsk, 1996).

Também no epitélio das vias aéreas seria factível de especulação a existência de um possível fator hiperpolarizante derivado do epitélio (EpDHF). No presente trabalho nenhuma estratégia farmacológica usada para bloquear os canais de K⁺ interferiu com o relaxamento causado pela BK na TC+E, descartando assim a possibilidade de que, nesta preparação, o EpDRF possa ser representado por um dos acima mencionados canais de K⁺. Alternativamente aos canais de K⁺, uma possível participação do K⁺ no relaxamento da TC+E poderia ser a via reguladora de transporte de íons, como a Na⁺-K⁺-ATPase. Uma evidência para a presença do EpDHF no epitélio da TC é a de que a ouabaína, um inibidor da Na⁺-K⁺-ATPase, inibiu significativamente o relaxamento causado pela BK. Aumentos moderados na concentração de K⁺ mio-endotelial pode induzir hiperpolarização das células musculares lisas por ativação da Na⁺-K⁺-ATPase (Busse *et al.*, 2002). A ouabaína seletivamente se liga à Na⁺-K⁺-ATPase, e inibe as respostas mediadas pelo EDHF em vasos, sem afetar o potencial de membrana (Harris *et al.*, 2000). Trabalhos recentes mostraram que a Na⁺-K⁺-ATPase atua como transdutor de sinal. A ligação da ouabaína à Na⁺-K⁺-ATPase altera a interação desta enzima transportadora com proteínas da membrana, resultando em ativação de Src quinases, PI₃ quinases, MAPKs, FLC e PKC, transativação do EGFR e aumento na produção de espécies reativas do O₂ (Xie, 2003; Liu *et al.*, 2003; 2004; Isenovic *et al.*, 2004; Lei *et al.*,

2004; Taub *et al.*, 2004). Dodson e Rhoden (2001) descreveram pela primeira vez que a BK aumenta a atividade da bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em culturas primárias de células de músculo liso traqueal de cobraia. Este achado coincide com nossos resultados, onde a ouabaína apresentou efeito inibitório marcante sobre a resposta relaxante da BK na TC+E.

Nossos resultados confirmam e estendem resultados prévios (Charette *et al.*, 1995) e mostram que na TC+E, a COX-2 está constitutivamente expressa e os prostanóide(s) liberados são dependentes da atividade da COX-2, sendo responsáveis pela produção de um tônus intrínseco e podendo ser inibidos por indometacina, NS 398 e outros inibidores seletivos da COX-2 incubados nestas preparações. Além disso, os inibidores da COX e o inibidor da EGFR-Trk, o tirfostin AG 490, reduziram o tônus da TC+E, provavelmente pela inibição desta enzima constitutiva, crítica para a produção e manutenção do tônus.

O efeito de prostanóides nas vias aéreas pode ser tanto pró- quanto anti-inflamatório dependendo do tipo de célula, do balanço de prostanóides liberados e do subtipo de receptor prostanóide ativado. A PGE_2 pode ser uma forte candidata a EpDRF atuando como uma prostaglandina protetora (Pavord e Tattersfield, 1995), enquanto que a PGD_2 , a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o tromboxano A_2 seriam os mediadores pró-inflamatórios contracturantes (Iwamoto *et al.*, 1995).

As diferenças interespecie observadas na produção de prostanóides parecem ser muito grandes. Por exemplo, sob condições basais, a COX-1 parece ser a isoenzima responsável pela produção de prostanóides, principalmente a PGE_2 , em

cultura primária de músculo liso traqueal e em células epiteliais humanas (Pang e Knox, 1997a,b). Também nestes tecidos, a BK causou liberação da quimocina IL-8, sendo este efeito reduzido de forma importante por inibidores da COX-2 (Pang e Knox, 1998). Este mesmo perfil de produção de IL-8 pela BK foi observado em células epiteliais humanas imortalizadas (Rodgers *et al.*, 2002). A produção de prostanóides e de NO após estímulos inflamatórios depende da ativação da COX-2 e da iNOS, sendo ambas as enzimas suscetíveis ao processo de indução. Estes achados são interessantes pelo fato de que nossos resultados mostram que o inibidor seletivo da COX-1 não foi capaz de inibir o relaxamento induzido pela BK na TC+E, e a expressão protéica desta enzima não foi detectada em homogenatos traqueais de cobaia sob condições basais ou após estímulo com BK. Já a enzima COX-2 pode ser induzida por citocinas em um grande número de células das vias aéreas incluindo o epitélio e o músculo liso (Mitchell *et al.*, 1994; Belvisi *et al.*, 1998). Os mesmos autores mencionados acima demonstraram mais recentemente que a geração de IL-8 pelas células epiteliais traqueais pode contribuir para a dependência da produção de prostanóides endógenos a partir da COX-2 (Rodgers *et al.*, 2002). Não está claro até o presente momento quais são as conseqüências da indução da COX-2 e se a produção de prostaglandinas poderia ter efeitos deletérios ou benéficos na TC.

A PGE₂ é um importante mediador inflamatório que pode ter efeitos bronco-protetores nas vias aéreas (Pavord e Tattersfield, 1995). A produção deste prostanóide poderia exercer mecanismo de retro-alimentação negativa contra estímulos inflamatórios. Sabe-se que a COX-2 inibe a proliferação das células de

musculatura lisa das vias aéreas humanas, contribuindo dessa forma para conter o estreitamento das mesmas em alguns pacientes, parecendo exercer um papel protetor em doenças tais como a asma (Belvisi *et al.*, 1998). No presente estudo, verificamos que os inibidores da COX-2 reduzem a resposta relaxante da BK na TC+E. O inibidor preferencial da COX-2, o NS 398, inibiu o relaxamento induzido pela BK em concentração nanomolares, enquanto que os inibidores preferenciais de COX-2 como o rofecoxibe e o DFU, mostraram efeitos inibitórios em concentrações micromolares. Entretanto, este último inibidor seletivo da COX-2 não foi capaz de reverter o relaxamento para contração na TC+E, diferente do que foi observado para o NS 398 e para a indometacina. A razão desses efeitos discrepantes permanece por ser esclarecida. O inibidor seletivo de COX-1, o SC 560, não apresentou efeito significativo sobre o relaxamento da BK, bem como em relação à liberação de PGE₂ na TC+E após a adição de BK nas preparações, excluindo assim o envolvimento da isoforma COX-1 nas ações relaxantes da BK.

Com o objetivo de caracterizar o subtipo de receptor para a PGE₂ envolvido nas ações da BK na TC+E, avaliamos a influência de inibidores seletivos dos subtipos de receptores EP para a PGE₂ na resposta relaxante à BK. Os antagonistas seletivos dos receptores EP₁ (SC 19220), EP₁/EP₂ (AH 6809) e EP₄ (L 161982) foram destituídos de efeito. Entretanto, o antagonista seletivo dos receptores EP₃ (L 826266) mostrou inibição significativa sobre a resposta relaxante da BK, sugerindo a participação deste receptor após a liberação de PGE₂ induzida pela BK na TC+E. Os resultados do presente estudo sugerem, portanto, que este efeito provavelmente

envolve a ativação do subtipo de receptores EP₃, mas não EP₁, EP₂ ou EP₄. Este receptor parece ser o candidato mais indicado para causar efeitos relaxantes, por rotas tradicionais, para as respostas induzidas pela PGE₂.

Usualmente os receptores B₂ acoplados à proteína G promovem suas ações pela ativação de vias transduccionais convencionais como, por exemplo, a via da adenilato ciclase/cAMP (Pal-Ghosh *et al.*, 2003; Bradbury *et al.*, 2003), FLA_{2S} (Pyne *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999) e FLC (Voyno-Yasenetskaya *et al.*, 1988; Portilla *et al.*, 1988; Pyne e Pyne, 1993a), causando elevação no metabolismo do inositol fosfato (Tilly *et al.*, 1987; Derian e Moskowitz, 1986) e da produção de diacilglicerol (Francel e Dawson, 1988). A geração de inositol-1, 4, 5-trifosfato e seus metabólitos causa elevação da concentração de Ca²⁺ citoplasmático. Em alguns casos, alterações na concentração de Ca²⁺ extracelular podem ser co-dependentes da ativação da PKC (Sage *et al.*, 1989) ou da FLA₂, que por sua vez libera ácido araquidônico (Snider e Richelson, 1984). A ativação direta da FLA₂ pela proteína G aumenta a possibilidade de que as alterações primárias envolvidas na resposta relaxante da BK na TC+E sejam independentes do Ca²⁺ extracelular, mas a amplificação e o aumento da resposta podem ser mediados por efeitos de segundos mensageiros, como a estimulação autócrina por prostaglandinas, um evento que pode envolver o influxo de Ca²⁺ extracelular, fosfolipase D (Pyne e Pyne, 1993b; Clark e Murray, 1995), proteína quinase C (Clark e Murray, 1995; Pang *et al.*, 2002), L-arginina/NO/guanilato ciclase (Schlemper e Calixto *et al.*, 1994;

Ricciardolo *et al.*, 1994), entre outros. Usualmente a BK e a PGE₂ exercem suas ações inibitórias pela ativação da adenilato ciclase/ PKA. Entretanto, nestes sistemas a falta de efeito de inibidores da adenilato ciclase e de PKA excluem esta possibilidade.

Desta maneira, a PGE₂ teria uma função como substância autócrina para estimular a síntese de cAMP devido à ligação a uma proteína G_s acoplada a um receptor, que teria a adenilato ciclase como efetador da resposta (Schorr, 1993; Graves *et al.*, 1993). Mais recentemente, estudos indicaram que a indução da COX-2 pela BK em células de músculo liso de artéria pulmonar humana é mediada pelo elemento de resposta do AMPc (CRE) e sua ativação se dá através de uma nova alça autócrina de receptores EP₂ e EP₄ envolvendo a PGE₂ endógena, com estimulação da adenilato ciclase, resultando em aumento de cAMP e ativação da proteína quinase A, o que leva à ativação de promotores de COX-2 (Bradbury *et al.* 2003).

Uma substância candidata como importante fator relaxante nas vias aéreas de cobaias é o NO, uma vez que a BK libera simultaneamente prostanóides inibitórios e NO (Bramley *et al.*, 1990; Schlemper e Calixto, 1994; Ricciardolo *et al.*, 1994; Ricciardolo *et al.*, 2000). O NO é produzido por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais, nervos, músculo liso, células inflamatórias e endoteliais vasculares. Além disso, foi proposto que a via da L-arginina/NO desempenha um papel importante na regulação do tônus broncomotor (Belvisi *et al.*, 1991; Barnes e Belvisi, 1993). Ricciardolo *et al.* (1994) demonstraram que a administração de BK por aerossol aumenta a resistência pulmonar de cobaias

anestesiadas e o pré-tratamento com inibidores não seletivos da NOS, a N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ou a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) aumentou a resposta broncoconstrictora para a BK aerosolizada. Três isoformas de NOS foram identificadas por purificação protéica e clonagem molecular. A isoenzima neuronal (nNOS ou NOS1), a induzível (iNOS ou NOS2) e a endotelial (eNOS ou NOS3). Todas as isoformas são produtos de diferentes genes presentes em cromossomos distintos (Knowles e Moncada, 1994), sendo que todas as três enzimas estão expressas nas vias aéreas (Fischer *et al.*, 1993; Hamid *et al.*, 1993). Foi também demonstrado que nas vias aéreas, a cNOS é expressa em células neuronais (nNOS), endoteliais (eNOS) e epiteliais (nNOS e eNOS) (Gaston *et al.*, 1997). Nossos resultados confirmam e estendem essas observações e mostram que a expressão constitutiva das isoformas eNOS e nNOS, mas não da iNOS ocorre na traquéia de cobaia. Um achado interessante neste contexto, é que a adição de BK por 10 min na traquéia, causou aumento significativo na expressão da eNOS e da nNOS. Isto poderia ser explicado pelo fato de que estas duas isoenzimas poderiam estar confinadas em cavéolas nas superfícies celulares. Diante do estímulo com BK, ocorreria a translocação sub-celular da eNOS ativa para o plasmalema, e para fora das membranas mitocondriais e intracelulares (como o aparelho de Golgi) (Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 1997). Usando a cavéola de células endoteliais intactas como ponto de referência, foram apresentadas evidências ultraestruturais em um ensaio de órgão isolado em que a caveolina-1 atua como ancoradouro para a eNOS, e que a mesma pode ser ativada por rápida estimulação com cininas a uma

velocidade espantosa (Garcia-Cardena *et al.* 1997; Ju *et al.* 1997; Michel *et al.* 1997. Foi também relatado que a eNOS pode estar na forma ativa quando ligada à caveolina-1 (Reiner *et al.*, 2001). É um tanto sugestivo que um mecanismo semelhante ao que ocorre nas células endoteliais também ocorra no epitélio, além de já ter sido descrito que o gene da caveolina-1 foi detectado em tecidos de coelho tais como o epitélio da córnea, traquéia e músculo cardíaco (Qaddoumi *et al.*, 2003). No endotélio, a caveolina-1 regula a sinalização da via do óxido nítrico por ligação e inibição da eNOS. O aumento nos níveis do Ca^{2+} citosólico ou a ativação da quinase Akt leva à ativação da eNOS e sua dissociação da caveolina-1.

Outro assunto de nosso interesse e investigado nesse estudo, foi analisar se poderia haver um “cross-talk” entre a COX-2 e a NOS. Porém, como o inibidor da NOS aminoguanidina não interferiu na liberação de PGE_2 para o meio, isto poderia sugerir que a COX-2 aumenta a ativação das NOSs constitutivas. As NOSs poderiam ser ativadas paralela e independentemente da COX-2, via receptor B_2 , em virtude de que o inibidor preferencial da NOS, a 7-NINA inibiu apenas parcialmente a resposta relaxante induzida pela BK. Uma outra possibilidade seria a ativação direta da NOS por uma Trk (Minshall *et al.*, 2003).

Um dos resultados mais relevantes obtidos no presente estudo e que contribuiu para explicar os mecanismos transduccionais envolvidos no relaxamento causado pela BK na TC+E, foi a demonstração, pela primeira vez, de que além de liberar metabólitos da via da COX e do NO, a BK causa paralelamente, a ativação de EGFRs-Trk, sugerindo que estes estariam envolvidos na resposta funcional

relaxante da BK na TC+E. A ativação de receptores acoplados aos GPCRs, tal como aquela dos receptores B₂ da BK, pode estimular cascatas distintas das MAPKs, classicamente associadas com a sinalização através de Trks (Gutkind, 1998; Luttrell *et al.*, 1999). Em sistemas de células COS-7 co-transfectadas com o receptor B₂ humano e MAPK marcada com hemaglutinina, foi demonstrada a existência da via mitogênica dupla, permanente de ativação da MAPK pela BK (Adomeit *et al.*, 1999). O efeito da ativação dos receptores B₂ sobre as MAPKs é mediado pela subunidade α de uma proteína G_{q/11}, sendo prevenido por inibidores da PKC ou do EGFR, mas não pelos inibidores da PI₃K ou Src. Os mesmos autores citados acima demonstraram ainda que a via de sinalização da BK para ativação da MAPK envolve a ativação de isoformas da PKC sensíveis ao diacilglicerol como a PKC $_{\alpha}$ e a PKC $_{\epsilon}$ (Adomeit *et al.*, 1999). Entretanto, a fosforilação da Trk do receptor EGF pela BK nas células COS-7 não parece ser mediada pela PKC, sugerindo que a ativação da MAPK pela BK via EGF é uma via de sinalização distinta daquela envolvendo o diacilglicerol (DAG) e a PKC. As respostas induzidas pela BK causam co-expressão de isoformas mutantes de PKC inativas e constitutivamente ativas e fornecem evidências para um papel crítico exercido pelas PKCs α e ϵ dependente de DAG (Adomeit *et al.*, 1999). Tendo em vista que inibidores clássicos da PKC não foram capazes de inibir a resposta relaxante causada pela BK na TC+E, é possível sugerir que essa resposta relaxante à BK independe das PKC. A possibilidade do envolvimento da cascata das MAPKs no efeito relaxante da BK na TC+E também

poderia ser descartada em nosso sistema, devido à ausência de efeito de inibidores seletivos das MAPKs, como o SB 203580 e o PD 98059, bem como dos inibidores de PKC, a estaurosporina e o GF 109203x. Recentemente, Pang *et al.* (2002) estudando células de músculo liso de vias aéreas humanas, detectaram forte imunorreatividade para as isoformas da PKC- α , β -I, β -II, δ , ϵ e γ em condições basais. Após a estimulação com a BK por 10 min, a PKC- α e a PKC- β -I (da via clássica ou o grupo Ca^{2+} -dependente e PKC- δ), e a PKC- ϵ (do grupo Ca^{2+} -independente) foram translocadas do citosol para a fração da membrana (Pang *et al.*, 2002). Esta isoforma da PKC especialmente a PKC- ϵ é um componente vital da via de transdução sinalizadora pós-receptor para a BK, responsável pela expressão da COX-2 em células musculares lisas das vias aéreas humanas (Pang *et al.*, 2002). No presente estudo, não existem portanto, evidências indicando a participação da PKC na ativação de Trks, pois os inibidores de PKC e FLC não interferiram com a resposta relaxante induzida pela BK ou pela PGE_2 .

Está atualmente muito bem estabelecido que receptores acoplados à proteína G (GPCRs) podem induzir múltiplos sinais através de transativação de EGFRs dependente da atividade de uma PKC. Entretanto, os GPCRs induzem profunda dessensibilização de EGFRs através de um processo associado à perda dos EGFRs na superfície celular, secundária à endocitose causada pela clatrina (Grewal *et al.*, 2001). Existem, contudo, evidências experimentais mostrando que o EGF regula a contratilidade do músculo liso (Tamada *et al.*, 2000), incluindo na TC+E (Nasuhara

et al., 1996). Neste último estudo, os resultados foram variáveis, pois os investigadores obtiveram efeitos contracturantes e relaxantes para o EGF de camundongo sobre a TC+E. É possível que este fenômeno seja devido ao tônus predominante presente na preparação, e quando a TC+E estava sob baixo tônus houve resposta contrátil, e sob tônus elevado houve resposta relaxante, muito similar à resposta produzida pela BK e pela PGE₂ no presente estudo. Além disso, os mesmos autores mostraram também o envolvimento de metabólitos da cascata do AA, principalmente a PGE₂ na resposta relaxante ao EGF (Nasuhara *et al.*, 1996). Em conjunto esses resultados sugerem que o efeito do EGF sobre o músculo liso das vias aéreas é basicamente contrátil, e a estimulação do epitélio das vias aéreas com EGF pode modificar a resposta do músculo liso, por mecanismos que suprimem a contração, levando ao relaxamento. Em nosso trabalho, os inibidores da Trk, assim como os inibidores da COX-2, aboliram a resposta relaxante induzida pela BK na TC+E bem como a liberação de PGE₂ para o meio nutritivo. Estes resultados permitem sugerir, portanto, que a BK ao estimular os receptores B₂, ativa o processo de transativação do EGFR-Trk e que este, por sua vez causaria a ativação da COX-2 constitutiva, com conseqüente liberação de PGE₂ e posterior ativação dos receptores EP₃, causando relaxamento da TC+E (Figura 16).

A PGE₂ é usualmente considerada uma prostaglandina vasodilatadora e os receptores envolvidos neste efeito geralmente são os subtipos EP₂ e/ou EP₄, os quais estão acoplados eficientemente às proteínas G_s (Coleman *et al.*, 1994). Entretanto, em diferentes tipos de tecidos vasculares de várias espécies animais, a ativação do

subtipo EP₃, assim como o subtipo EP₁ de receptores EP, causa vasoconstrição (Qian *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1998; Jones e Chan, 2001). Os agonistas dos receptores EP₃ produzem fraca contração, porém eles têm atraído a atenção de pesquisadores devido a existência de múltiplas isoformas. Até o momento foram caracterizados oito subtipos de receptores EP₃ em humanos (Namba *et al.*, 1993; Pierce e Regan, 1998; Breyer *et al.*, 2001). Essas isoformas de receptores são diferencialmente expressas nos tecidos, interagem praticamente com todos os agonistas destes receptores, mas mostram diferentes modos de acoplamento aos diferentes sistemas de segundos mensageiros intracelulares. Todas as isoformas acoplam-se a uma proteína G_i resultando em inibição da adenilato ciclase, enquanto que algumas também se acoplam à proteínas do tipo G_s, ativando a adenilato ciclase e/ou G_q para ativar uma FLC. Nos últimos anos foi caracterizada na aorta de cobaia, uma possível via de ativação do receptor EP_{3B} acoplado a uma G₁₃, com envolvimento de uma pequena proteína G (*small G protein*), que por sua vez está acoplada a uma Rho quinase. Esta Rho quinase também está envolvida com a contração do músculo liso vascular, através da inibição da miosina fosfatase e da sensibilização ao Ca²⁺ (Somlyo e Somlyo, 2000; Fukata *et al.*, 2001; Somlyo *et al.*, 2000). Assim, estudos adicionais são ainda necessários para o melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta relaxante para a BK através da liberação de PGE₂ e ativação dos receptores EP na TC+E.

Curiosamente, nossos resultados mostram que outras vias sinalizadoras relevantes frequentemente envolvidas nas ações da BK, tais como ativação de canais

de K^+ , do NF- κ B, PKA, C e G, FLA₂ e C ou MAPKs parecem não contribuir para o relaxamento mediado pela BK na TC+E. Neste contexto, o relaxamento causado pela BK na TC+E parece envolver mecanismos não-clássicos de transdução, diferentes daqueles usualmente descritos nas ações relaxantes da BK *in vitro* (Chand *et al.*, 1987; Pyne *et al.*, 1997; Van Heuven-Nolsen *et al.*, 1997; Teoh e Man, 2000; Mazzuco *et al.*, 2000; Mukhin *et al.*, 2003).

Em resumo, os resultados do presente estudo fornecem suporte experimental considerável, indicando que a BK, semelhante à PGE₂, induz relaxamento de maneira concentração e tempo dependentes na TC+E através da ativação de receptores B₂, com estimulação da enzima COX-2 constitutiva e conseqüente produção de PGE₂. Além disso, os efeitos da PGE₂ estão relacionados com a ativação de receptores EP₃. Os dados aqui apresentados também demonstram que a liberação de NO, presumivelmente através da estimulação tanto da eNOS como da nNOS, também contribui para a ação relaxante da BK nesta preparação. Um evento novo e relevante para os mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pela BK na TC+E é sua capacidade de ativar a EGFR-Trk, provavelmente levando à liberação de PGE₂. Um breve esquema resumindo os eventos principais envolvidos no relaxamento da BK na TC+E está apresentado na Figura 16. Coletivamente, os resultados do presente estudo fornecem uma visão compreensiva a respeito dos possíveis mecanismos através dos quais a BK induz contração ou relaxamento na TC, com ênfase no papel do epitélio e dos prostanóides presentes no mesmo. A sinalização intracelular envolvida nas respostas contracturantes e relaxantes para a BK foram também objeto de investigação

no presente estudo, e os resultados obtidos demonstram a participação de um complexo mecanismo de sinalização intracelular, inclui entre outros, a participação da COX-2 presente constitutivamente, tanto no efeito contrátil como no relaxante, com liberação de elevados níveis de PGE₂ que, por sua vez, ativaria receptores EP₃. Acopladas às ações da BK na TC, estariam também as enzimas eNOS e nNOS responsáveis pela liberação de NO, tanto do epitélio, como dos terminais nervosos e/ou músculo liso, onde exercem um importante efeito relaxante sobre este tecido. Do ponto de vista das vias intracelulares, os resultados do presente estudo indicam que vias de sinalização importantes e comumente associadas com as ações da BK como a FLC, inositol trifosfato, PKC, AMPc, GMPc, MAPKs, entre outros, não parecem participar das ações da BK na TC. Porém, um resultado importante até aqui ainda não demonstrado, foi a observação de que a EGFR-Trk parece ser uma importante via de sinalização das ações relaxantes da BK na TC. Soma-se a isso o possível envolvimento da bomba Na⁺-K⁺-ATPase, que surge como nova via sinalizadora, inclusive com o envolvimento alternativo da transativação com o próprio EGFR-Trk. Finalmente, merece destaque o fato de que, embora seja bastante conhecido, as ações da BK na ativação dos receptores B₂ sofrem frequentemente dessensibilização, os resultados do presente estudo mostram que na TC, apenas a resposta contrátil à BK é suscetível ao fenômeno de dessensibilização, um efeito que pode ser completamente prevenido por inibidores da COX-2. Assim, com base nos presentes resultados, pode-se afirmar que a BK, em conjunto com os prostanóides e o NO exerce um papel modulador contrátil e relaxante importante nas vias aéreas de cobaias.

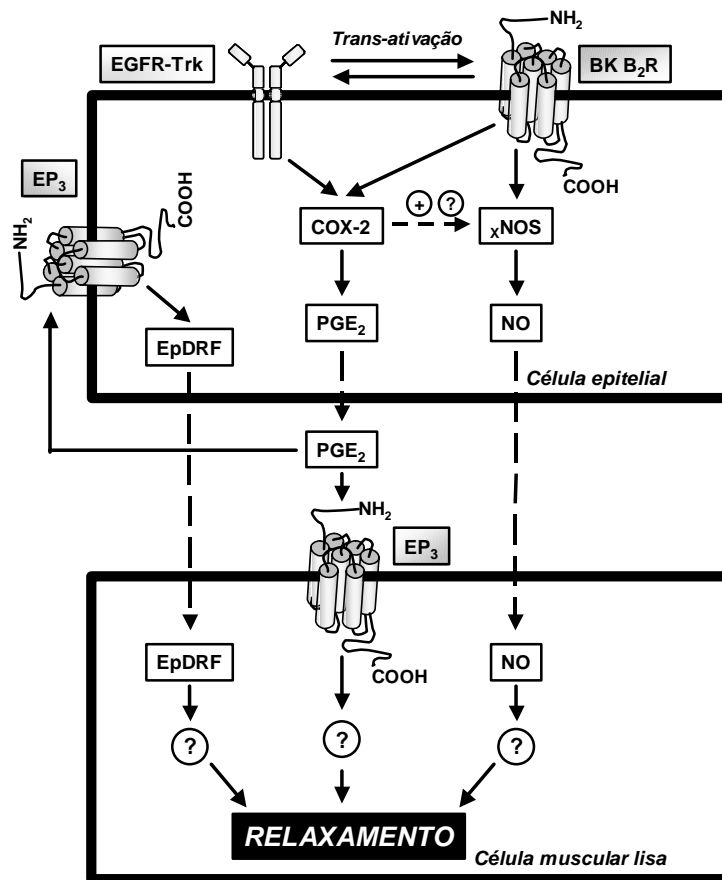


Figura 16 - Possíveis mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pela BK na TC+E. A BK causa suas respostas relaxantes através da ativação de receptores B₂. A estimulação dos receptores B₂ leva à ativação da COX-2 e a liberação de PGE₂. Pelo menos em parte, as ações da BK são dependentes da liberação de PGE₂, provavelmente atuando via receptores EP₃. Outro componente da resposta relaxante da BK é a via da L-arginina/NO. A trans-ativação do EGFR-Trk parece ser também envolvida nas respostas relaxantes da BK e poderia ativar a COX-2, que por sua vez, liberaria a PGE₂ e/ou modularia as xNOS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOMEIT, A., GRANESS, A., GROSS, S., SEEDORF, K., WETZKER, R.; LIEBMANN, C. (1999). Bradykinin B₂ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:5289-5297.
- AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. (1999). B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1?, *Trends. Pharmacol. Sci.* ,**20**: 100-4.
- ANDRADE, S. O.; SILVA, M.R. (1956). Purification of bradykinin by íon exchange chromatography. *Biochem. J.*, **64**: 701-705.
- ANGERS, M., DROUIN, R., BACHVAROVA, M., PARADISM, I., MARCEAU, F. ; BACHVAROV, D. R. (2000). In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *J. Cel. Biochem.* **78**: 278-296.
- ASANO, K., LILLY, C. M. ; DRAZEN, M. (1996). Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **271**: (Lung Cell. Mol. Physiol.), **15**: L126-L131.
- BACHVAROV, D. R., SAINT-JACQUES, E., LARRIVEE, J. F., 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.
- BARNES, P. J. ; BELVISI, M . G. (1993). Nitric oxide and lung disease. *Thorax.*, **48**: 1034-43.
- BARNES, P. J. (1992). Bradykinin and asthma. *Thorax.* **47**: 979-83.
- BASCANDS, J.L., PECHER, C., ROUAUD, S., EMOND, C., TACK, J.L., BASTIE, M.J., BURCH,R., ; REGOLI D., GIROLAMI, J.P. (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, **264**: F548-56.
- BATENBURG, W. W., POPP, R., FLEMING, I., DE VRIES, R., GARRELDS, I. M., SAXENA, P. R. ; DANSER, A. H. (2004). Bradykinin-induced relaxation of coronary microarteries: S-nitrosothiols as EDHF? *Br. J. Pharmacol.*, **142**: 125-35.
- BATHON, J. M. ; PROUD, D. (1991), Bradykinin antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**:129-62.
- BELVISI, M. G., SAUNDERS, M. A., HADDAD, E-B, HIRST, S. J., YACOUB, M. H., BARNES, P. J. ; MITCHELL, J. A. (1997). Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 910-916.
- BELVISI, M.G., SAUNDERS, M., YACOUB, M.; MITCHELL, J.A. (1998). Expression of cyclo-oxygenase-2 in human airway smooth muscle is associated with profound reductions in cell growth. *Br. J. Pharmacol.* **125**: 1102-1108.

- BELVISI, M. G., STRETTON, D. ; BARNES, P. J. (1991) Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, **198**: 219-221.
- BENY, J. L., BRUNET, P. ; HUGGEL, H. (1987). Interaction of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin with isolated pig coronary arteries: Mechanical and electrophysiological events. *Regul. Pept.*, **17**: 181-190.
- BERTRAND, C. ; TSCHIRHART, E. (1993). Epithelial factors: modulation of the airway smooth muscle tone. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **7**:261-73.
- BHATTACHARYA, D. K., LECOMTE, M., DUNN, J., MORGANS, D. J. ; SMITH, W. L. (1995). Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**: 19-24.
- BHOOLA, K. D., FIGUEROA, C. D. ; WORTHY, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 1.
- BLAIS C, J.R., LAPOINTE. N., ROULEAU, J.L., CLEMENT, R., BACHVAROV, D.R.; ADAM, A. (2002). Effects of captopril and omapatrilat on early post-myocardial infarction survival and cardiac hemodynamics in rats: interaction with cardiac cytokine expression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **80**: 48-58.
- BLAUKAT, A. (2003). Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia*, **35**: 17-23.
- BLAUKAT, A., BARAC, A., CROSS, M. J., OFFERMANN, S. ; DIKIC, I. (2000). G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Gαq and Gαi signals. *Mol. Cell Biol.*, **20**:6837–6848.
- BLAUKAT, A., PIZARD, A., WERNSTEDT, C., ALHENC-GELAS, F., MULLER-ESTERL, W. ; DIKIC, I. (2001). Determination of the bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J. Biol. Chem.* **276**:40431–40440.
- BOISSONNAS, R. A., GUTTMANN, S. ; JAQUENOUD, P. A. (1960). Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta.*, **43**:1349-1355.
- BRADBURY, D. A., NEWTON, R., ZHU, Y. M., EL-HAROON, H., CORBETT, L. ; KNOX, A. J. (2003). COX-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous PGE₂, EP₂ and EP₄ receptors. *J. Biol. Chem.*, **278**: 49954-64.
- BRAMLEY, A.M., SAMHOUN, M.N. ; PIPER, P.J. (1989). Effect of a bradykinin B2 antagonist on responses of intact and rubbed guinea-pig trachea in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **98**: Suppl:786P.
- BRAMLEY, A.M., SAMHOUN, M.N.; PIPER, P.J. (1990). The role of the epithelium in modulating the responses of guinea-pig trachea induced by bradykinin in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **99**:762-6.
- BRAUNSTEIN, G., LABAT, C., BRUNELLESCHI, S., BENVENISTE, J., MARSAC., J ; BRINK, C. (1988). Evidence that histamine sensitivity and responsiveness of guinea-pig isolated trachea are modulated by epithelial prostaglandin E₂. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 300-308.

- BREYER, R.M., BAGDASSARIAN, C.K., MYERS, S.A. ; BREYER MD. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**:661-90.
- BURCH, R. M.; AXELROD, J. (1987). Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 6374-6378.
- BURCH, R.M. ; KYLE, D.J. (1992). Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci*, **50**: 829-38.
- BURGAUD, J.L., JAVELLAUD, J. ; OUDART, N. (1993). Do perfused small caliber airways of guinea-pig release an epithelium-dependent relaxing factor?. *Pulm. Pharmacol*, **6**: 217-224.
- BURGESS, G. M., MULLANEY, I., MCNEILL, M., COOTE, P. R., MINHAS, A.; WOOD, J. N. (1989). Activation of guanylate cyclase by bradykinin in rat sensory neurones is mediated by calcium influx: possible role of the increase in cyclic GMP. *J. Neurochem*, **53**: 1212-8.
- BUSSE, R., EDWARDS, G., FELETOU, M., FLEMING, I, VANHOUTTE, P. M. ; WESTON, A. H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**:374-80.
- CAHILL, M., FISHMAN, J. B. ; POLGAR, P. (1988). Effect of des arginine-9-bradykinin and other bradykinin fragments on the synthesis of prostacyclin and the binding of bradykinin by vascular cells in culture. *Agents Actions*, **24**: 224-231.
- CALIXTO, J. B. (1995). Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea pig smooth muscles in vitro. *Eur J Pharmacol.*, **281**: 279-88.
- CALIXTO, J.B, CABRINI, D.A., FERREIRA, J. ; CAMPOS MM. (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain*, **87**(1):1-5
- CALIXTO, J.B., MEDEIROS, R., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D.A. ; CAMPOS, M.M. (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.*, **143**: 803-18.
- CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. (1995). Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 1005-13.
- CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. (2000) Neurokinin mediation on edema and inflammation . *Neuropeptides*, **34**: 314-322.
- CARRETERO, O. A.; SCICLI, A. G. (1990) Kinins as regulators of blood flow and blood pressure. *Hypertension Pathophys. Dyagnosis and Management*, Ed by J. H. Laragh and B. M. Brenner, Raven Press Ltda, N. Y.
- CAYLA, C., MERINO, V. F., CABRINI, D. A., SILVA, J.A. JR, PESQUERO, J. B. ; BADER M. (2002). Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int. Immunopharmacol.* **2**: 1721-1727.
- CHAN, D. C., GERA, L., STEWART, J. M., HELFRICH, B., ZHAO, T. L., FENG, W. Y., CHAN, K., COVEY, J. M., BUNN, P. A. JR. (2002). Bradykinin antagonist dimer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines in vitro and in vivo and produces synergistic growth inhibition in combination with other antitumor agents. *Clin. Cancer Res.*, **8**:1280-7.

- CHAND, N., DIAMANTIS, W. ; SOFIA RD. (1987). The obligatory role of calcium in the development of antigen-induced airway hyperreactivity to cold provocation in the rat isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **91**: 17-22.
- CHARETTE, L., MISQUITA, C., GUAY, J., RIENDEAU, D ; JONES, T. R. (1995). Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig trachea. *Can. J. Pharmacol.*, **73**: 1561-1567.
- CHEN, B. C., YU, C. C., LEI, H. C., CHABG, M. S., HSU, M. J., HUANG, C. L., CHEN, M. C., SHEU, J. R., CHEN, T. F., CHEN, T. L., INOUE, H. ; LIN, C. H. (2004). Bradykinin B₂ receptor mediates NF-kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression via the ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. *J. Immunol.*, **173**: 5219-5228.
- 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**:1225-32.
- CHUNG, K. F. ; BARNES, P.J. (1999). Cytokines in asthma. *Thorax.*, **54**: 825-57.
- CHURCHILL, L.; WARD, P. E. (1987). Conversion of B1 kinin receptor-mediated vascular relaxation to contraction. *Hypertension*, **9**: 1-5.
- CLARK, K. J.; MURRAY, A.W. (1995). Evidence that the bradykinin-induced activation of phospholipase D of the mitogen-activated protein kinase cascade involve different protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.*, **270**: 7097-7103.
- COLEMAN, R. A., SMITH , W. L. ; NARUMIYA, S. (1994). International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **46**: 205-229.
- D'ACQUISTO, F., IALENTI, A., IANARO, A ; CARNUCCIO, R. (1999). Nuclear factor-kappaB activation mediates inducible nitric oxide synthase expression in carrageenin-induced rat pleurisy. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **360**: 670-5.
- DA SILVA, A., AMRANI, Y., TRIFILIEFF, A. ; LANDRY, Y. (1995). Involvement of B₂ receptors in the bradykinin-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 103-108.
- DE WEERD, W.F.; LEEB-LUNDBERG, L.M. (1997). Bradykinin sequesters B₂ bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α_q and G α_i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells . *J. Biol. Chem.*, **272**: 17858-66.
- DELAMERE, f., HOLLAND, E., PATEL, S., BENNET, J., PAVORD, I. ; KNOX, A. (1994) Production of PGE₂ by bovine cultured airway smooth muscle cells and its inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, **111**: 983-988.
- DERIAN, C. K.; MOSKOWITZ, M. A. (1986). Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. *J. Biol. Chem.*, **261**: 3831-3837.
- DODSON, A. M. ; RHODEN, K. J. (2001). Bradykinin increases Na⁺-K⁺ pump activity in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **133**: 1339-1345.

- DRAY, A., PATEL, I. A., PERKINS, M. N. ; 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.*, 107:1129-34.
- DUNER, T., CONLON, J. M., KUKKONEN, J. P., AKERMAN, K. E., YAN, Y. L., POSTLETHWAIT, J. H. ; LARHAMMAR, D. (2002). Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B2-related receptor. *Biochem J.*, **364**: 817-824.
- 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**:
- ELLIOT, D. F. (1970). The discovery and characterization of bradykinin. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **25**: 7-13.
- ELLIS, K.M. ; FOZARD, J.R. (2002). Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, **22**: 3-16.
- ERDÖS, E. G. ; YANG, H. Y. T. (1967). An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sci.*, **6**: 569-574.
- ERDÖS, E. G. ; YANG, H. Y. T. (1970). Kininases. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **25**: 289-323.
- ERDÖS, E. G., RENFREW, A. G., SLOANE, E. M. ; WHOLER, J. R. (1963). Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **104**: 222-235.
- EXTON, J. H. (2002). Phospholipase D-structure, regulation, and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **144**: 1-94.
- FARMER SG, BURCH RM, DEHAAS CJ, TOGO J, STERANKA LR. [1989). Arg1-D-Phe7]-substituted bradykinin analogs I; inhibit bradykinin- and vasopressin-induced contractions of uterine smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* ;**248**: 677-81.
- FARMER, S.G. (1991). Role of kinins in airway diseases. *Immunopharmacology.*, **22**: 1-20.
- FARMER, S. G. ; BURCH, R. M. (1991). Airway bradykinin receptors. *Annals of the New York Academy Sciences*, **629**: 237-249.
- FARMER, S. G. ; BURCH, R. M. (1992). Biochemical and molecular pharmacology of kinins receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**: 511-536.
- FARMER, S. G. ; DESIATO, M. A.(1994). Effects of a novel nonpeptide bradykinin B₂ receptor antagonist, on intestinal and airway smooth muscle. Further evidence for the tracheal B₃ receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **112**: 461-464.
- FARMER, S. G. (1992). Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**: 511-36.
- FARMER, S. G., BURCH, R. M., MEEKER, S. N. ; WILKINS, D. F. (1989). Evidence for a pulmonary bradykinin B₃ receptor. *Mol. Pharmacol.*, **36**: 1 – 8.

- FARMER, S. G., ENSOR, J. E. ; BURCH, R. M. (1991) Evidence that cultured airway smooth muscle cells contain bradykinin B₂ and B₃ receptors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **4**: 273-277.
- FARMER, S. G., POWELL, S. J., WILKINS, D. E. ; GRAHAM, A. (1998). Cloning, sequencing and functional expression of a guinea pig lung bradykinin B₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **346**: 291-298.
- FAUSSNER, A., BATHON, J. M. ; PROUD, D. (1999). Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacol.*, **45**: 13-20.
- FAUSSNER, A., PROUD, D., TOWNS, M. ; BATHON, J. M. (1998). Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **273**: 2617-2623.
- FEDAN, J. S.; FRAZER, D. (1992). Influence of epithelium on the reactivity of guinea pig isolated perfused trachea to bronchoactive drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**: 741-750.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTE, P. M. (2003). Third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *Drug Develop. Res.*, **58**: 18-22.
- FERNANDES, L.B., PATERSON, J.W. ; GOLDIE, R.G. (1989). Co-axial bioassay of a smooth muscle relaxant factor released from guinea-pig tracheal epithelium. *Br. J. Pharmacol.* , **96**: 117-24.
- FERNANDES, L. B. ; GOLDIE, R. G. (1991). Antigen-induced release of airway epithelium-derived inhibitory factor. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **143**: 567-71.
- FERNANDES, L.B.; GOLDIE, R.G. (1990). Pharmacological evaluation of a guinea-pig tracheal epithelium-derived inhibitory factor (EpDIF). *Br. J. Pharmacol.*, **100**: 614-618.
- FERON, O., MICHEL, J. B., SASE, K. ; MICHEL, T. (1998a). Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry*, **37**:193-200.
- FERON, O., SALDANA, F., MICHEL J. B. ; MICHEL, T. (1998b). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.*, **273**:3125-3128.
- FERREIRA, S. H. ; VANE, J. R. (1967). The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br. J. Pharmacol.*, **30**: 417-424.
- FERREIRA, S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. *Br. J. Pharmacol.*, **24**:163-9.
- FERREIRA, S. H. (1976). The relative role of peptidase in the metabolism of peptides. In Fogarty International Center Proceedings, vol. 27: Chemistry and Biology of the Kallikrein-Kinin System in Health and Disease, ed. By J. J. Pisano and K. F. Austen, pp. 295-297.
- FIELD, J. L., HALL, J. M. ; MORTON, I. K. M. (1992). Putative novel bradykinin B₃ receptors in the smooth muscle of the guinea-pig *Taenia caeci* and trachea. *Agents Actions*, **38**:540-545, Suppl. I.

- FIGINI, M., RICCIARDOLO, F.L., JAVDAN, P., NIJKAMP, F.P., EMANUELI, C., PRADELLES, P., FOLKERTS, G. ; GEPPETTI P. (1996). Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in the guinea pig trachea is nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **153**: 918-23.
- FISCHER, A., MUNDEL, P., MAYER, B., PREISSLER, U., PHILIPPIN, B. ; KUMMER, W. (1993). Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosc. Lett.*, **149**, 157-160.
- FLAVAHAN, N.A.; AARHUS, L.L.; RIMELE, T.J.; VANHOUTTE, P.M. (1985). Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.*, **58**: 834-838.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. (1997). Tyrosine phosphorylation and bradykinin-induced signaling in endothelial cells. *Am. J. Cardiol.*, **80**:102A-109A.
- FOLKERTS, G. ; NIJKAMP, F.P. (1998). Airway epithelium: more than just a barrier. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 334-341.
- FOLKERTS, G. ; ENGELS, F.; NIJKAMP, F.P. (1989). Endotoxin-induced hyperreactivity of the guinea-pig isolated trachea coincides with decreased prostaglandin E₂ production by the epithelial layer. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 388-394.
- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H.H., POLLOCK, J.S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER T.D., NAKANE M.; MURAD, F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.*, **42**: 1849-57.
- FRANCEL, P.; DAWSON, G. (1988). Bradykinin induces the biphasic production of lysophosphatidyl inositol and diacylglycerol in a dorsal root ganglion x neurotumour hybrid cell line F-11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 724-731.
- FRITZ, H., SCHMIDT, I.; DIETZE, G. (1989). *The kallikrein-kinin system in health and disease*. In: International Symposium, Munich, 1988.
- FUKATA, Y., AMANO, M. ; KAIBUCHI, K. (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**:32-9.
- FROSSARD, N., RHODEN, K.J. ; BARNES, P.J. (1989). Influence of epithelium on guinea pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. *Pharmacol. Exp. Ther.* **248**(1):292-8.
- GABRA, B. H., COUTURE, R ; SIRROIS, P. (2003). Dualité fonctionnelle des kinines en physiopathologie. *Med. Sci.*, **19**: 1101-10.
- GAGINELLA, T. S. ; KACHUR, J. F. (1989). Kinin as mediators of intestinal secretion. *Am. J. Physiol.*, **256**: G1-G15.
- GARCIA-CARDENA, G., MARTASEK, P., MASTERS, B. S., SKIDD, P. M., COUET, J., LI, S., LISANTI, M, P. ; SESSA, W. C. (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 25437-25440.
- GASTON, B. L., KOBZIK, L. ; STAMLER, J. S. (1997). Distribution of nitric oxide synthase in the lung. In: ZAPOL, W.M.; BLOCH, K.D. *Nitric oxide in the lung*. New York : Marcel Dekker, p. 75-86.

- GOBEIL, F. JR., CHARLAND, S., FILTEAU, C., PERRON, S. I., NEUGEBAUER, W. ; REGOLI, D. (1999). Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension.*, **33**: 823-9.
- GOBEIL, F., WNEUGEBAUER, W., NGUYEN-LE, X.K., NEA ALLOGHO, S., PHENG, L.H., BLOUIN, D., HALLEY, E.T. ; REGOLI, D. (1997). Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**: 591-5.
- GOHLA, A., OFFERMANN, S., WILKIE, T. M. ; SCHULTZ, G. (1999). Differential involvement of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ in receptor-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.*, **274**: 17901–17907.
- GOLDIE, R. G., FERNANDES, L. B., FARMER, S. G. ; HAY, D. W. (1990). Airway epithelium- derived inhibitory factor. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**: 67-70.
- GOLDSTEIN, R. H. ; WALL, M. (1984). Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin. *J. Biol. Chem.*, **259**: 9263-9268.
- GRANESS, A., ADOMEIT, A., LUDWIG, B., MULLER, W. D., KAUFMANN, R., ; LIEBMANN, C. (1997). Novel bradykinin signalling events in PC-12 cells: stimulation of the cAMP pathway leads to cAMP-mediated translocation of protein kinase C epsilon. *Biochem. J.*, **327**:147–154.
- GRANESS, A., HANKE, S., BOEHMER, F. D., PRESEK, P. ; LIEBMANN, C. (2000) Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells. *Biochem. J.*, **347**: 441-7.
- GRAVES, L. M., BORNFELDT, K. E., RAINES, E. W., POLTS, B. C., MACDONALD, S. G. ROSS, R. ; KREBS, E. G (1993). Protein kinase A antagonizes platelet derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **90**: 10300-10304.
- GREENE, E. L., VELARDE, V. ; JAFFA, A. A. (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension.*, **35**: 942-7.
- GREWAL, J. S., LUTTRELL, L. M., ; RAYMOND, J. R. (2001). G Protein-coupled receptors desensitize and down-regulate epidermal growth factor receptors in renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **276**: 27335–27344.
- GUTKIND, J. S. (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **273**: 1839-1842.
- GUTOWSKI, S., SMRCKA, A., NOWAK, L., WU, D. G., SIMON, M. ; STERNWEIS, P. C. (1991). Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5- biphosphate hydrolysis by hormones. *J. Biol. Chem.*, **266**: 20519-20524.
- HAASEMAN, M.; CARTAUD, J.; MÜLLER-ESTERL, W.; DUNIA, I. (1998). Agonist-induced redistribution of bradykinin B₂ receptor in caveolae. *J. Cell. Sci.*, **111**: 917-28.

- HALL, J.M. (1992). Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190.
- HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. (1997). The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S. G. *The kinin system*. London : Academic Press, p. 9-43.
- HAMID, Q.; SPRINGALL, D.R.; RIVEROS-MORENO, P.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J.M. (1993). Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet.*, **342**: 1510-1513.
- HARGREAVES, K.M.; TROULLOS, E.S.; DIONNE, R.A.; SCHMIDT, E.A.; SCHAFER, S.C.; JORIS, J.L. (1988). Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **44**: 613-21.
- HARRIS, D.; MARTIN, P.E.; EVANS, W.H.; KENDALL, D.A.; GRIFFITH, T.M.; RANDALL, M.D. (2000). Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K (+) -relaxation. *Eur. J. Pharmacol.*, **402**: 119-28.
- HARVEY, J.S.; BURGESS, G.M. (1993). A nitric oxide synthase inhibitor reduces desensitisation of bradykinin-induced activation of phospholipase C in sensory neurones. *Biochem. Soc. Trans.*, **21**: 435S.
- HAY, D.W.; FARMER, S.G.; RAEBURN, D.; ROBINSON, V.A.; FLEMING, W.W.; FEDAN, J.S. (1986). Airway epithelium modulates the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **129**: 11-8.
- HAY, D.W., VAN SCOTT, M.R.; MUCCITELLI, R.M. (1997). Characterization of endothelin release from guinea-pig tracheal epithelium: influence of proinflammatory mediators including major basic protein. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **10**: 189-98.
- HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. (2000). Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Eur. Respir. J.*, **16**: 452-8.
- HAYNE C.; TZIVION, G.; LUO, Z. (2000). Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J. Biol. Chem.*, **275**: 31876-82.
- HENDRIKS, D.; WANG, W.; SCHARPE, S.; LOMMAERT, M. P.; VAN SANDE, M. (1990). Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**: 86-92.
- HESS, J.F. (1997). Molecular pharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S. G. *The kinin system*. London : Academic Press, p. 45-55.
- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; STONESIFER, G.Y.; MACNEIL, T.; STRADER, C. D.; RANSOM, R.W. (1994). Cloning and pharmacological characterization of bradykinin receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **27**:1725-31.

- HESS, J.F.; BORKOWSKI, J.A.; YOUNG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSOM, R.W. (1992). Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**: 260-8.
- HESS, J.F.; DERRICK, A.W.; MACNEIL, T.; BORKOWSKI, J.A. (1996). The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology*. **33**: 1-8.
- HESS, J.F.; HEY, P.J.; CHEN, T.B.; O'BRIEN, J.; OMALLEY, S.S.; PETTIBONE, D.J.; CHANG, R.S. (2001). Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biol. Chem.*, **382**: 123-129.
- HESS, J.F.; HEY, P.J.; CHEN, T.B.; PETTIBONE, D.J.; CHANG, R.S. (2002). Molecular and pharmacological diversity of the kinin B1 receptor. *Int. Immunopharmacol.*, **2**: 1747-1754.
- HOLGADO-MOLINA, E., ORTIZ, S., HOLGADO-MOLINA, F.; GUAZA, C. (2000). Induction of COX-2 and PGE₂ biosynthesis by IL-1 β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **131**: 152-159.
- HUR, E.M.; PARK, Y.S.; LEE, B.D.; JANG, I.H.; KIM, H.S.; KIM, T.D.; SUH, P.G.; RYU, S.H.; KIM, K.T. (2004). Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src— implications for a role of lipid microdomains. *J. Biol. Chem.*, **279**: 5852-5860.
- ICHINOSE, M., BELVISI, M.G.; BARNES, P.J. (1990). Bradykinin-induced broncho constriction in guinea-pig in vivo: role of neural mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**: 594-599.
- IGNARRO, L.J.; KADOWITZ, P.J. (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**: 171-91.
- ILHAN, M. ; SAHIN, I. (1986). Tracheal epithelium releases a vascular smooth muscle relaxant factor: demonstration by bioassay. *Eur J Pharmacol.* 131: 293-6. *Erratum in: Eur. J. Pharmacol.* 1987 136: 140.
- IMIG, J.D. (2004). ACE inhibition and bradykinin-mediated renal vascular responses: EDHF involvement. *Hypertension*. **43**: 533-5.
- INOUE, H.; KOTO, H.; TAKATA, S.; AIZAWA, H.; IKEDA, T. (1992). Excitatory role of axon reflex in bradykinin-induced contraction of guinea pig tracheal smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**: 1548-1552.
- ISENOVIC, E.R.; MENG, Y.; JAMALI, N.; MILIVOJEVIC, N.; SOWERS, J.R. (2004). Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. *Int. J. Mol. Med.*, **13**: 915-22.
- ISHIDA, H.; SCICLI, A.G.; CARRETERO, O.A. (1989). Contributions of various rat plasma peptidases to kinin hydrolysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**: 817-20.
- IWAMOTO, I.; UMIBE, T.; NAKAJIMA, H.; YOSHIDA, S. (1995). Effect of a selective thromboxane A₂ receptor antagonist Bay-U3405 on antigen-induced and leukotriene C₄-induced bronchoconstriction in guinea-pigs. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **108**: 68-73.

- JANSEN, L.J. (2002) Are endothelium-derived hyperpolarizing and contracting factors isoprostanes? *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 59-62.
- JOHNSTON, S.L.; FREEZER, N.J.; RITTER, W.; OTOOLE, S.; HOWARTH, P.H. (1995). Prostaglandin D₂-induced bronchoconstriction is mediated in part by the thromboxane prostanoid receptor. *Eur. Respir. J.*, **8**: 411-415.
- JONES, R.L.; CHAN, K.M. (2001). Distinction between relaxations induced via prostanoid EP(4) and IP(1) receptors in pig and rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.*, **134**:313-24.
- JONES, R.L.; QYAN, Y.M.; CHAN, K.M.; YIM, A.P.C. (1998). Characterization of a prostanoid receptor in guinea pig aorta: partial agonist action of the non-prostanoid EP₃ receptor ONO-AP-324. *Br. J. Pharmacol.*, **125**: 1288-1296.
- JONG, Y.J.; DALEMAR, L.R.; WILHELM, B.; BAENZIGER, N.L. (1996). Human lung fibroblasts express multiple means for enhanced activity of bradykinin receptor pathways. *Immunopharmacology*, **33**: 9-15.
- JU, H.; VENEMA, V.J.; LIANG, H.; HARRIS, M.B.; ZOU, R.; VENEMA, R.C. (2000) Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activator of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signaling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem. J.*, **351**:257–264.
- JU, H.; ZOU, R.; VENEMA, V.J.; VENEMA, R.C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.*, **272**:18522-18525.
- KAUFMAN, M.P.; CLERIDGE, H.M.; COLLERIDGE, J.C.G.; BAKER, D.G. (1980) bradykinin stimulates afferent vagal C-fibres I intra-pulmonary airways of dogs. *J. Appl. Physiol.*, **48**: 511-517.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, **298**: 249-258.
- KOTLIKOFF, M.I. (1993). Potassium channels in airway smooth muscle: a tale of two channels. *Pharmac. Ther.*, **58**, 1-12.
- KRASEL, C., BUNEMANN, M., LORENZ, K.; LOHSE MJ. (2005). Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **280**: 9528-35.
- KREMER, S.; HARPER, P.; HEGELE, R.; SKORECKI, K. (1988). Bradykinin stimulates a rise in cytosolic calcium in renal glomerular mesangial cells via a pertussis toxin insensitive pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **66**: 43-48.
- LAMB, M.E.; DE WEERD, W.F.; LEEB-LUNDBERG, L.M. (2001). Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem. J.*, **355**: 741-50.
- LANE-PETTER, W.; PEARSON, A. E. G. (1971). The laboratory animal – Principles and Practice. Academic Press INC., London.

- LAITINEN, L.A., HEINO, M., LAITINEN, A., KAVA, T. ;HAAHTELA T. (1985) Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.***131**: 599-606.
- LEE, S.D., LEE, B.D., KYM, Y., SUH, P.G.; RYU, S.H. (2000). Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, **294**: 130-132.
- LEI, J.; MARIASH, C.N.; INGBAR, D.H. (2004). 3,3',5-triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J. Biol. Chem.*, **279**: 47589-600.
- LEMBECK, F., GRIESBACHER, T., ECKHARDT, M., HENKE, S., BREIPOHL, G. ; KNOLLE J. (1991). New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 297-304.
- LI, C.-S., CAMERON BLACK, W., BRIDEAU, C., CHAN, C.C., CHARLESON, S., CROMLISH, W.A., CLAVEAU, D., GAUTHIER, J.Y., GORDON, R., GREIG, G., GRIMM, E., GUAY, J., LAU, C.K., RIENDEAU, D. , THÉRIEN, M, VISCO, D.M., WONG, E., XU, L. ; PRASIT, P. (1999). A new structural variation on the methanesulfonylphenyl class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**: 3181-86.
- LI, L., VAALI, K., PAAKKARI, I. ; VAPAATALO, H. (1998). Involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptors in relaxation of mouse isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 1337-1342.
- LI, C.S., BLACK, W.C., BRIDEAU, C., CHAN, C.C., CHARLESON, S., CROMLISH, W.A. ; CLAVEAU, D., GAUTHIER, J.Y., GORDON, R., GREIG, G., GRIMM, E., GUAY, J., LAU, C.K., RIENDEAU, D., THERIEN, M.,VISCO, D.M., WONG, E., XU, L. ; PRASIT, P. A new structural variation on the methanesulfonylphenyl class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**: 3181-6.
- LIEBMANN, C. (2001). Bradykinin signaling to MAP kinase: cell specific connections versus principal mitogenic pathways. *Biol. Chem.*, **382**:49-55.
- LIEBMANN C, REISSMANN S, ROBBERECHT P, AROLD H. (1987). Bradykinin action in the rat duodenum: receptor binding and influence on the cyclic AMP system. *Biomed. Biochim. Acta.*, **46**: 469-78.
- LIU, J., KESIRY, R., PERIYASAMY, S. M., MALHOTRA, D., XIE, Z. ; SHAPIRO, J. I. (2004). Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney Int.*, **66**: 227-41.
- LIU, L., MOHAMMADI, K., AYNAFSHAR, B., WANG, H., LI, D., LIU, J., IVANOV, A. V., XIE, Z. ; ASKARI, A. (2003). Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺/K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**: C1550-C1560.
- LUO, S.F., WANG, C. C., CHIEN, C. S., HSIAO, L. D.; YANG, C. M. (2003) Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells: involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Cell Signal.*, **15**: 497-509.
- LUTTRELL, L.M., DAAKA, Y.; LEFKOWITZ, R. J. (1999). Regulation tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptor. *Curr. Opin Cell Biol.*, **11**: 177-183.

- MA, J. X., WANG, D. Z., CHAO, L.; CHAO, J. (1994). Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B2 receptor. *Gene*, **149**: 283-288.
- MACNEIL, T., BIERILO, K. K., MENKE, J. G. ; HESS, J. F. (1995). Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B1 receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1264**: 223-228.
- MANNING, D.C., VAVREK, R., STEWART, J.M.; SNYDER, S.H.J (1986). Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *Pharmacol Exp Ther.*, **237**: 504-12.
- MARCEAU, F. ; BACHVAROV, D. R. (1998). Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **16**: 385-401.
- MARCEAU, F., HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* **50**: 357-86.
- MARCEAU, F. ; REGOLI, D. (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**: 845-52.
- 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., LARRIVEÉ, J. F., SAINT-JACQUES, E. ; BACHAROV, D. R. (1997). The kinin B₁ receptor: an inducible G protein-coupled receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**: 725-730.
- MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D.; GIROUD, J. P. (1983). Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.*, **14**: 209-29.
- MARCIC, B., DEDDISH, P. A., SKIDGEL, R. A., ERDÖS, E. G., MINSHALL, R. D. ; TAN, F. (2000). Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **275**:16110–16118.
- MAZZUCO, T. L., ANDRÉ, E ; CALIXTO, J. B. (2000). Contribution of nitric oxide prostanoids and Ca²⁺-activated K⁺ channels to the relaxant response of bradykinin in the guinea-pig bronchus in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **361**: 383-390.
- MCEACHERN, A. E., SHELTON, E. R., BHAKTA, S., OBERNOLTE, R., BACH, C., ZUPPAN, P., FUJISAKI, J., ALDRICH, R. W. ; JARNAGIN, K. (1991). Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **88**: 7724-8
- MCGEHEE, D. S., GOY, M. F. ; OXFORD, G. S. (1992). Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the desensitization of bradykinin responses of cultured rat sensory neurons. *Neuron.*, **9**: 315-24.
- 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**: 346-55. Erratum in: *Mol. Pharmacol.* **45**: 561.

- MELENDEZ, A., FLOTO, R. A., GILLOOLY, D. J., HARNETT, M. M.; ALLEN, J. M. (1998). FcγRI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J. Biol. Chem.*, **273**:9393-402.
- MENKE, J. G., BORKOWSKI, J. A., BIERILO, K. K., MACNEIL, T., DERRICK, A. W., SCHNECK, K. A., RANSOM, R. W., STRADER, C. D. LINEMEYER, D. L. ; HESS, F. J. (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21583-21586.
- MICHAEL, R., WILHELM, B. ; KLAUS, A. (2001). Functional Interaction of Caveolin-1 and eNOS in Myocardial Capillary Endothelium Revealed by Immunoelectron Microscopy *J. Histochem. and Cytochem.*, **49**: 1605-1610.
- MICHEL, J. B., FERON, O., SACKS, D. ; MICHEL, T. (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* **272**: 15583-15586.
- MINSHALL, R. D., SESSA, W. C., STAN, R. V., ANDERSON, R. G. ; MALIK, A. B. (2003). Caveolin regulation of endothelial function. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **285**: L1179-83.
- MITCHELL, J.A., BELVISI, M. AKARASEREENONT, M., ROBBINS, P., KWON, R., CROXTALL, J., BARNES, P.J. ; VANE, J. R. (1994). Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1008-1014.
- MOHAMMADI, K., LIU, L., TIAN, J., KOMETIANI, P., XIE, Z. ; ASKARI, A. (2003). Positive inotropic effect of ouabain on the isolated heart is accompanied by the activation of signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **41**: 609-14.
- MONTANO, L. M., SELMAN, M., PONCE-MONTER, H. ; VARGAS, M. H. (1988). Role of airway epithelium on the reactivity of smooth muscle from guinea pigs sensitized to ovalbumin by inhalatory method. *Res. Exp. Med. (Berl.)*, **188**:167-73.
- MORRIS, S. M. ; BILLIAR, T. R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J. Physiol.*, **266**: E829-39.
- MUKHIN, Y.V., GARNOVSKY, E.A., ULLIAN, M.E. ; GARNOVSKAYA, M.N. (2003). Bradykinin B2 receptor activates extracellular signal-regulated protein kinase in mIMCD-3 cells via epidermal growth factor receptor transactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**: 968-77.
- MURAKAMI, M., KAMBE, T., SHIMBARA, S. ; KUDO, I. (1999). Functional coupling between various phospholipase A₂s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.*, **374**: 3103-3115.
- NAGAO, T. ; VANHOUTTE, P.M. (1992). Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery., *J. Physiol.*, **445**: 355–367.
- NAMBA, T., SUGIMOTO, Y., NEGISHI, M., IRIE, A., USHIKUBI, F., KAKIZUKA, A., ITO, S., ICHIKAWA, A. ; NARUMIYA S. (1993). Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature*. **365**:166-70.
- NASUHARA, Y., MINAKATA, M., SATO, A, AMISHIMA, M., HOMMA, Y. ; KAWAKAMI, Y. (1996). Mechanisms of epidermal growth factor-induced contraction of guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.*, **296**: 161-168.

- NI, A., CHAI, K.X., CHAO, L.; CHAO, J. (1998). Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1442**: 177-85.
- NELLI, S., DOWELL, F. J., WILSON, W. S., STIRRAT, A. ; MARTIN, W. (2004). Requirement for flow in the blockade of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) by ascorbate in the bovine ciliary artery. *Br. J. Pharmacol.* , **142**: 1081-90.
- NIELSEN-KUDSK, J. E. (1996). Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. *Dan. Med. Bull.*, **43**: 429-47.
- OHNISHI, Y., HIRANO, K., NISHIMURA, J., FURUE, M.; KANAIDE, H. (2001). Inhibitory effects of brefeldin A, a membrane transport blocker, on the bradykinin-induced hyperpolarization-mediated relaxation in the porcine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **134**: 168-78.
- OLMOS, L., MOMBOULI, J.V., ILLIANO, S. ; VANHOUTTE, P. M. (1995). cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, **268**: H865-70.
- ONDETTI MA, RUBIN B ; CUSHMAN DW. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.
- ONDETTI, M. A., RUBIN, B., CUSHMAN, D.W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.
- OSTROM, R. S., GREGORIAN, C., DRENAN, R. M., XIANG, Y., REGAN, J. W. ; INSEL, P. A. Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 276: 42063–42069, 2001.
- PAEGELOW, I., WERNER, H., VIETINGHOFF, G. ; WARTNER, U. (1995) Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. *Inflamm. Res.*, **44**:306-11.
- PAL-GHOSH, R., YU, J., PRADO, G. N., TAYLOR, L., MIERKE, D. F. ; POLGARA, P. (2003). Chimeric exchanges within the bradykinin B₂ receptor intracellular face with the prostaglandin EP₂ receptor as the donor: importance of the second intracellular loop for cAMP synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**: 54–62.
- PANG, L. ; KNOX, A. J. (1997a). Effect of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **121**: 579-587.
- PANG, L. ; KNOX, A. J. (1997b). PGE₂ release by bradykinin in human airway smooth muscle cells: involvement of cyclooxygenase-2 induction. *Am. J. Physiol.*, **273**: L1132-L1140.
- PANG, L. ; KNOX, A. J. (1998). Bradykinin stimulates prostaglandin E₂ production in cultured human airway smooth muscle cells: role of cyclooxygenase products. *J. Immunol.*, **161**: 2509-2515.
- PANG, L., NIE, M., CORBETT, L., DONNELLY, R., GRAY, S. ; KNOX, A.J. (2002). Protein kinase C- ϵ mediates bradykinin-induced cyclooxygenase–2 expression in human airway smooth muscle cells. *FASEB J.*, **16**: 1435-38.

- PAVORD, I. D. ; TATTERSFIELD, A. E. (1995). Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E₂. *Lancet*, **345**: 436-438.
- PESQUERO, J. B., BADER, M. (1998). Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 1197-1203.
- PESQUERO, J. B., LINDSEY, C. J., ZEH, K., PAIVA, A. C. M., GANTEN, D. ; BADER, M. (1994). Molecular structure and expression of rat bradykinin B₂ receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **269**: 26920-26925.
- PESQUERO, J. B., PESQUERO, J. L., OLIVEIRA, S. M., ROSCHER, A. A., 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.
- PHAGOO, S. B, POOLE, S. ; LEEB-LUNDBERG, L. M. (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*, **56**: 325-33.
- PIERCE, K.L.; REGAN, J.W. (1998). Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing., **62**: 1479-83.
- PIZARD, A., BLAUKAT, A., MULLER-ESTERL, W., ALHENC-GELAS, F. ; RAJERISON, R.M. (1999). Bradykinin-induced internalization of the human B₂ receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J. Biol. Chem.*, **274**:12738-47.
- PORTILLA, D., MORRISEY, J., ; MORRISON, A.R. (1988). Bradykinin-activated membrane- associate phospholipase C in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest.*, **81**: 1896-1902.
- PRADO, G. N., TAYLOR, L., ZHOU, X., RICUPERO, D., MIERKE, D. L. ; POLGAR, P. (2002). Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *J. Cel. Physiol.*, **193**: 275-286.
- PRAT, A., WEINRIB, L., BECHER, B., POIRIER, J., DUQUETTE, P., COUTURE, R. ; ANTEL, J. P. (1999). Bradykinin B₁ receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. *Neurology*, **53**: 2087-2092.
- PROUD, D. ; KAPLAN, A. P. (1988). Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.*, **6**:49-83.
- PROUD, D., BAUMGARTEN, C. R., NACLERIO, R. M.; WARD PE. (1987). Kinin metabolism in human nasal secretions during experimentally induced allergic rhinitis. *J. Immunol.*, **138**: 428-34.
- PROUD, D., REYNOLDS, C.J., BROOMFIELD, J., GOLDMAN, D.W. ; BATHON J.M. (1993). Bradykinin effects in guinea pig tracheal epithelial cells are mediated through a B₂ kinin receptor and can be inhibited by the selective antagonist Hoe 140. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**: 1124-31.
- PYNE, N. J., TOLAN, D ; PYNE, S. (1997). Bradykinin stimulates cAMP synthesis via mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of cytosolic phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ release in airway smooth muscle. *Biochem. J.*, **328**: 689-694.

- PYNE, S.; PYNE, N. J. (1993a). Bradykinin stimulates phospholipase D in primary cultures of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Biochem. Pharmacol.*, **45**: 593-603.
- PYNE, S. ; PYNE, N. J., (1993b). Differential effects of B₂ receptor antagonists upon bradykinin-stimulated phospholipase C and D in guinea-pig cultured tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 477-481.
- QADDOUMI, M. G., GUKASYAN, H. J., DAVDA, J., LABHASETWAR, V., KIM, K. J. ; LEE, V. H. (2003). Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis. *Mol. Vis.*, **15**: 9:559-68.
- QIAN, Y.M., JONES, R.L., CHAN, K.M., STOCK, A.I.; HO JK. (1994). Potent contractile actions of prostanoid EP3-receptor agonists on human isolated pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* **113**: 369-74.
- RAEBURN, D. (1990). Eicosanoids epithelium and airway reactivity. *Gen. Pharmacol.*, **21**: 11-16.
- RANGACHARI, P.K., BEREZIN, M. ; PRIOR, T. (1993). Effects of bradykinin on the canine proximal colon. *Regul. Pept.*, **46**: 511-22.
- REGOLI, D. (1984). Neurohumoral regulation of precapillary vessels: The kalikrein-kinin system. *J. cardiovasc. Pharmacol.*, **6**: (Suppl 2): S401-S412.
- REGOLI, D., ; BARABÉ, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 1-46.
- REGOLI, D., RIZZI, A.; CALO, G. (1997). Pharmacology of the kallikrein-kinin system. *Pharmacol. Res.*, **35**: 513-5.
- REGOLI, D., NSA ALLOGHO, S., RIZZI, A. ; GOBEIL, F.J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists *Eur. J. Pharmacol.* **348**: 1-10.
- REINER, M., BLOCH, W.; ADDICKS, K.J. (2001). Functional interaction of caveolin-1 and eNOS in myocardial capillary endothelium revealed by immunoelectron microscopy. *Histochem. Cytochem.* **49**: 1605-10.
- REISER, G., WALTER, U. ; HAMPRECHT, B. (1984). Bradykinin regulates the level of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) in neural cell lines. *Brain Res.*, **290**: 367-71.
- REYNOLDS, C.J., TOGIAS, A. ; PROUD, D. (1999). Airway neural responses to kinins: tachyphylaxis and role of receptor subtypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159**: 431-8.
- RICCIARDOLO, F. L. M. (2003). Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, **58**: 175-182.
- RICCIARDOLO, F. L. M., NADEL, J. A., SHIHARA, S. Y. ; GEPETTI, P. (1994). Evidence for reduction of bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pigs by release of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1147-1152.

- RICCIARDOLO, F. L. M., VERGNANI, L., WIEGAND, S., RICCI, F., MANZOLI, N., FISCHER, A., AMADESI, S., FELLIN, R. ; GEPETTI, P. (2000). Detection of nitric oxide release induced by bradykinin in guinea pig trachea and main bronchi using a porphyrinic microsensor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **22**:97-104.
- RICUPERO, D. A., POLGAR, P., TAYLOR, L., SOWELL, M. O., GAY, Y., BRADWIN, G. ; MORTENSEN, R. M. (1997). Enhanced bradykinin-stimulated phospholipase C activity in murine embryonic stem cells lacking the G-protein alpha q-subunit. *Biochem. J.*, **327**: 803-809.
- RICUPERO, D. A., TAYLOR, L. ; POLGAR, P. (1993). Interactions of bradykinin, calcium, G-protein, and protein kinase in the activation of phospholipase A₂ in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents Actions*, **40**:110–118.
- RIENDEAU, D., PERCIVAL, M.D., BOYCE, S., BRIDEAU, C., CHARLSON, S., CRORALISH, W., ETHIER, D., EVANS, J., FALGUEYRET, J-P, FORD-HUTCHINSON, A. W., GORDON, R., GREIG, G., GRESSER, M., GUAY, J., KARGMAN, S., LÉGER, S., MANCINI, J.A., O'NEIL, G., OUELLET, M., RODGER, I.W., THÉRIEN, M., WANG, Z., WEBB, J. K., WONG, E., XU, L., YOUNG, R.N., ZAMBONI, R., PRESI, P ; CHAN, C. –C. (1997). Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, **121**: 105-117.
- RIZZO, M. A., SHOME, K., VASUDEVAN, C., STOLZ, D. B., SUNG, T. C., FROHMAN, M. A., WATKINS, S. C.; ROMERO, G. (1999). Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 1131-9.
- ROBERTS, R. A. ; GULLICH, W. J. (1990) Bradykinin receptors undergo ligand induced desensitization. *Biochemistry*, **29**: 1975-79.
- ROBERTS, R. A. (1989). Bradykinin receptors: characterization, distribution and mechanisms of signal transduction. *Prog. Growth. Factor. Res.*, **1**: 237-52.
- ROCHA E SILVA, M. (1955). Bradykinin: occurrence and properties. In: GADDUM, J. H. *Polypeptides which stimulate plain muscle*. Edimburgh: Livingstone, p. 45-57.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Amer. J. Physiol.*, **156**: 261-273.
- ROCH-ARVEILLER, M., ROBLIN, G., ALLAIN, M.; GIROUD JP. (1985). A visual technique of chemotactic assessment for pharmacological studies. *J. Pharmacol. Methods.*, **14**:313-21.
- RODGERS, H. C., PANG, L., HOLLAND, E., CORBETT, L., RANGE, S. ; KNOX, A. J. (2002). Bradykinin increases IL-8 generation in airway epithelial cells via COX-2-derived prostanoids. *Amer. J. Physiol.*, **283**(3): L612-18.
- ROSCHE, A.A., KLIER, C., DENGLER, R., FAUSSNER, A.; MULLER-ESTERL, W. (1990). Regulation of bradykinin action at the receptor level., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **6**: S39-43.

- RUEFF, A., PATEL, I.A., URBAN. L.; DRAY, A. (1994). Regulation of bradykinin sensitivity in peripheral sensory fibres of the neonatal rat by nitric oxide and cyclic GMP. *Neuropharmacology*, **33**: 1139-45.
- RUPNIAK, N. M., BOYCE, S., WEBB, J.K., WILLIAMS, A.R., CARLSON, E.J., HILL, R.G., BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F. (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.
- RYAN, J. W., ROBLERO, J. ; STEWART, J. M. (1970). Inactivation of bradykinin in rat lung. *In* Bradykinin and related kinins, ed. By F. Scuteri, M. Rocha e Silva and N. Back, *Advan. Exp. Med. Biol.*, **8**: 263-271.
- SAGE, S.O., ADANS, D. J. ; VAN BREEMEN, C. (1989). Synchronized oscillations I cytoplasmic free calcium concentration in confluent bradykinin stimulated bovine pulmonary artery endothelial cell mono-layers. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6-9.
- SARIA, A., MARTLING, C. -R., YAN, Z., THEODORSSON-NORHEIM, E., GAMSE, R. ; LUNDBERG, J. M. (1988). Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **137**: 1330-5.
- SAUNDERS, M. A., BELVISI, M. G., CIRINO, G., BARNES, P.J., WARNER, T. D. ; MITCHELL, J. A. (1999). Mechanisms of prostaglandin E₂ release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**: 1101-1106.
- SCHAEFFER, P., LAPLACE, M. C., SAVI, P., PRABONNAUD, V., SALEL, V. ; HERBERT, J. M. (2001). Detection of bradykinin B1 receptors in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.*, **61**: 291-298.
- SCHANSTRA, J. P., BATAILLE, E., MARIN CASTANO, M. E., BARASCUD, Y., HIRTZ, C., PESQUERO, J. B., PECHER, C., GAUTHIER, F., GIROLAMI, J. P. ; BASCANDS, J. L. (1998). The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **101**: 2080-91.
- SCHANSTRA, J. P., MARIN-CASTANO, M. E., ALRIC, C., PESQUERO, J. B., CLAIRE, M., GIROLAMI, J. P. ; BASCANDS, J. L. (1999). Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B1-receptor and B1-receptor localisation along the rat nephron. *Immunopharmacol.* **45**: 29-34.
- SCHERRER, D., DAEFFLER, L., TRIFILIEFF, A. ; GIES, J. -P. (1995). Effects of WIN 64338, a nonpeptide bradykinin B₂ receptor antagonist, on guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1127-1128.
- SCHERRER, D., SCHMIDLIN, F., HADDAD, E. B., KASSEL, O., LANDRY, Y. ; GIES, J. P. (1999). Glucocorticoids increase bradykinin B₂ receptor gene transcription in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **359**(3): 153-9.

- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J. B. (1994). Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **111**: 183-88.
- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J. B. (1995). Mechanisms involved in the relaxant response of bradykinin in epithelium intact strips of the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **282**: 177-184.
- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J. B. (2002). Mechanisms underlying the contraction induced by bradykinin in the guinea pig epithelium denuded trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **80**: 360-367.
- SCHMIDLIN, F., LOEFFLER, S., BERTRAND, C., LANDRY, Y ; GIES, J. P. (2000). FLA₂ phosphorylation and cyclooxygenase-2 induction, through p38 MAP kinase pathway, is involved in the IL-1beta-induced bradykinin B₂ receptor gene transcription. *Naunyn. Schimied. Arch. Pharmacol.*, **361**: 247-54.
- SCHMIDLIN, F., SCHERRER, D., LANDRY, Y. ; GIES, J. P. (1998). Glucocorticoids inhibit the bradykinin B₂ receptor increase induced by interleukin-1 β in human bronchial smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **354**: R7-R8.
- SCHMIDLIN, F., LOEFFLER, S., BERTRAND, C., LANDRY, Y. ; GIES, J.P. (2000). PLA₂ phosphorylation and cyclooxygenase-2 induction, through p38 MAP kinase pathway, is involved in the IL-1beta-induced bradykinin B₂ receptor gene transcription. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **361**: 247-54.
- SCHNECK, K.A., HESS, J.F., STONESIFER, G.Y.; RANSOM, R.W. (1994). Bradykinin B₁ receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.*, **266**: 277-82.
- 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**: 12475-81.
- SCHROR, K. (1993). The effect of prostaglandins and thromboxane A₂ on coronary vessel tone-mechanisms of action and therapeutic implications. *Eur. Heart. J.*, **14**: (Suppl. I), 34-41. *Science*. **96**: 441-4.
- SETHI, T.; ROZENGURT, E. (1991). Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of bradykinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin, and neurotensin. *Cancer Res.*, **51**: 3621-3.
- SIPAHI, E., ERCAN, Z. S. ; TÜRKER, R. K. (1998). Nitric oxide-mediated relaxation induced by bradykinin in the isolated mouse trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **352**: 263-268.
- SMITH, C. J., ZHANG, Y., KOBOLDT, C.M., et al. (1998). Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 13313-13318.
- SNIDER, R. M. ; RICHELSON, E. (1984). Bradykinin receptors-mediated cyclic GMP formation in a nerve cell population (murine neuroblastoma clone NIE-115). *J. Neurochem.*, **43**: 1749-1755.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* **522**: 177-85.

- SOMLYO, A.V., BRADSHAW, D., RAMOS, S., MURPHY, C., MYERS, C.E.; SOMLYO AP.(2000). Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**: 652-9.
- STERANKA, L. R., MANNING, D. C., DEHAAS, C. J., FERKANY, J. W., BOROSKY, S. A., CONNOR JR, VAVREK RJ, STEWART JM, SNYDER SH. (1988). Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **85**: 3245-9.
- STEWART, J.M. (2004). Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides.*, **25**: 527-32.
- STEWART JM, FERREIRA SH, GREENE LJ. (1971). Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 1557-67.
- STEWART, J.M., GERA, L., YORK, E.J., CHAN, D.C.; BUNN, P. (1999). Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacol.*, **43**:155-61.
- SU, D.S., MARKOWITZ, M.K., DIPARDO, R.M., MURPHY, K.L., HARRELL, C.M., O'MALLEY, S.S., RANSOM, R.W., CHANG, R.S., HA, S., HESS, F.J., PETTIBONE, D.J., MASON, G.S., BOYCE, S., FREIDINGER, R.M. ; BOCK M.G. (2003). Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 7516-7517.
- TAMADA, H., YOH, C., INABA, T., TAKANO, H., KAWATA, N. ; SAWADA, T. (2000). Epidermal growth factor (EGF) in the goat uterus: Immunohisto-chemical localization of EGF and EGF receptor and effect of EGF on uterine activity in vivo. *Theriogenology*, **54**: 159-169.
- TANAKA, H. K., WATANABE, K., TAMARU, N.; YOSHIDA, M. (1995). Arachidonic-acid metabolites and glucocorticoid regulatory mechanism in cultured porcine tracheal smooth-muscle cells. *Lung*, **173**: 347-361.
- TAUB, M., BORSICK, M., GEISEL, J., MATLHAGELA, K., RAJKHOWA, T.; ALLEN, C.(2004). Regulation of the Na,K-ATPase in MDCK cells by prostaglandin E1: a role for calcium as well as cAMP. *Exp. Cell Res.*, **299** :1-14.
- TEOH, H.; MAN, R.Y. (2000). Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17beta-estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade. *Br. J. Pharmacol.*, **129**: 1739-47.
- TAYLOR, L., RICUPERO, D., JEAN, J. C., JACKSON, B. A, NAVARRO, J. ; POLGAR, P. (1992). Functional expression of the bradykinin-B2 receptor cDNA in Chinese hamster lung CCL39 fibroblasts. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, **188**: 786-793.
- TILLY, B. C., VAN PARIDON, P. A., VERLAAN, I, WIRTZ, K. W. A., DE LAATY, S. W., ; MOOLENAAR, W. H. (1987). Inositol phosphate metabolism in bradykinin-stimulated human A31 carcinoma cells. *Biochem. J.*, **244**: 129-135.
- TOKUMOTO, H., CROXTALL, J. D. ; FLOWER, R. J. (1994). Diferential role of extra- and intracellular calcium in bradykinin and interleukin 1 alpha stimulation of arachidonic acid release from A459 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1211**: 301-309.

- TRIFILIEFF, A., AMRANI, Y., LANDRY, Y. ; GIES, J. -P. (1992) Comparative action of new highly potent bradykinin receptor antagonist in the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.*, **239**: 227-229.
- TRIFILIEFF, A., DA SILVA, A. ; GIES, J.P. (1993). Kinins and respiratory tract diseases. *Eur. Respir. J.*, **6**: 576-87.
- TRIFILIEFF, A., HADDAD, E.B., LANDRY, Y. ; GIES, J.P. (1991). Evidence for two high-affinity bradykinin binding sites in the guinea-pig lung. *Eur. J. Pharmacol.*, **207**: 129-34.
- TRIFILIEFF, A., DA SILVA, A., LANDRY, Y. ; GIES, J. -P. (1992) Effect of HOE 140, a new B₂ noncompetitive antagonist, on guinea-pig tracheal bradykinin receptors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **2**: 1377-1382.
- TSAI, M. H., HALL, A. ; STACEY, D. W. (1989). Inhibition by phospholipids of the interaction between R-ras, rho, and their GTPase-activating proteins. *Mol. Cell Biol.* **9**: 5260-4.
- TSCHIRHART, E. ; LANDRY, Y. (1986). Airway epithelium releases a relaxant factor: demonstration with substance P. *Eur. J. Pharmacol.*, **132**: 103-4.
- VANE, J. ; BOTTING, R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, **1**: 89-96.
- VAN HEUVEN-NOLSEN, D., WESTRA-DE VLIENER, J.F., MUIS, T., DENEE, J.H., RIVAS, T.O. ; NIJKAMP, F.P. (1997). Pharmacology and mode of action of bradykinin on mouse-isolated trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **356**: 134-8.
- VANHOUTTE, P.M. (1988). Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**:S24-30.
- VAVREK, R.J. ; STEWART, J.M. (1985). Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides*. **6**: 161-4.
- VENEMA, V. J., JU, H., SUN, J., EATON, D. C., MARRERO, M. B. ; VENEMA, R. C. (1998). Bradykinin stimulates the tyrosine phosphorylation and bradykinin B₂ receptor association of phospholipase C- α 1 in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**: 70-75.
- VENUGOPALAN, C. S., HOLMES, E. P., PILLAI, S. R., O'MALLEY, N. A. (1990). Epithelial influence on the tracheal nonadrenergic inhibitory response. *J. Auton. Pharmacol.*, **10**: 273-82.
- VIANNA, R. M. ; CALIXTO, J. B. (1998). Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 281-291.
- VINCENTINI, L. M. ; VILLERREAL, M. L. (1984). Serum, bradykinin and vasopressin stimulate release of inositol phosphates from human fibroblasts. *Biochem. Biophys Res. Comm.*, **123**: 663-67.
- VOYNO-YASENETSKAYA, T. A., PANCHENKO, M. P., NUPENKO, E. V., RYBIN, V. O., TKACHUK, V.A. (1989). Histamine and bradykinin stimulate the phosphoinositide turnover in human umbilical vein endothelial cells via different G-proteins. *FEBS. Lett.*, **259**: 67-70.
- VOYNO-YASENETSKAYA, T. A., TKACHUK, V. A., CHEKNYOVA, E. G., PANCHENKO, M. P., GRIGORIAN, G. Y., VAVREK, R. J., STEWART, J.M. ; RYAN, U.S. (1988). Guanine

nucleotide-dependent pertussis toxin-insensitive regulation of phosphoinositide turnover by bradykinin in bovine pulmonary artery endothelial cells. *FASEB. J.*, **3**: 44-51.

WATKINS, D. N., GARLEPP, M. J. ; THOMPSON, P. J. (1997). Regulation of the inducible cyclooxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **121**: 1482-1488.

WERLE, E., GOTZE, W. ; KEPPLER, A.(1937). Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und übereine neue darmkontrahierende Substanz., *Biochem. Z.*, **289**: 217-233.

WESSLER, I., HELLWIG, D., RACKE, K. (1990). Epithelium-derived inhibition of [3H] cetyl- choline release from the isolated guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **342**: 387-93.

WILLARS, G. B. ; NAHORSKI, S. R. (1995). Heterologous desensitization of both phosphoinositide and Ca²⁺ signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a role for intracellular Ca²⁺ store depletion?. *Mol. Pharmacol.*, **47**: 509-16

WILLARS, G. B., MULLER-ESTERL, W. ; NAHORSKI, S. R. (1999). Receptor phospho- rylation does not mediate cross talk between muscarinic M(3) and bradykinin B(2) receptors. *Am. J. Physiol.*, **277**: C859-69.

WIRTH, K., BREIPOHL, G., STECHL, J., KNOLLE, J., HENKE, S. ; SCHOLKENS, B. (1991) DesArg9-D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]bradykinin (desArg10-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **205**: 217-8.

XIE Z. (2003). Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.*, **986**: 497-503.

XIE, P., BROWNING, D. D., HAY, N., MACKMAN, N. ; YE, R. D. (2000). Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24907-14.

YANAGA, F., HIRATA, M. ; KOGA, T. (1991). Evidence for coupling of bradykinin receptors to a guanine-nucleotide binding protein to stimulate arachidonate liberation in the osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1094**:139-146.

YANG, X., TAYLOR, L.; POLGAR P. (2001). p53 down-regulates human bradykinin B1 receptor gene expression. *J. Cell Biochem.*, **82**: 38-45.

YU, J., PRADO, G. N., TAYLOR, L., PAL-GHOSH, R. ; POLGAR P. (2002). Hybrid formation between the intracellular faces of the bradykinin B2 and angiotensin II AT1 receptors and signal transduction. *Hybrid Int. Immunopharmacol.*, **2**: 1807-22.

YUNG, Y., YAO, Z., AEBERSOLD, D.M., HANOCH, T. ; SEGER, R. (2001). Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J. Biol. Chem.*, **276**: 35280-9.

ZHAO, Z., SHEN, S. H. ; FISCHER, E. H. (1993). Stimulation by phospholipids of a protein-tyrosine-phosphatase containing two src homology 2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **90**: 4251-5.

- 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, G. N., TAYLOR, L., 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.
- ZHOU, X., PRADO, G. N., TAYLOR, L., YANG, X. ; POLGAR, P. (2000). Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J. Cell Biochem.*, **78**: 351-362.

ANEXO I

Tabela 1 – Influência de diferentes drogas que interferem sobre a via da adenilato ciclase/AMPC sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. As respostas estão representadas em valores absolutos (mg de tensão) ou percentagem de resposta em relação ao relaxamento causado pelo nitroprusiato de sódio 100 nM (% da resposta Max. NPS 100 nM).

Drogas (concentração M)	Inibição	Relaxamento (mg) (% Resposta Máxima ao NPS 100 nM)		N
		Antes	depois	
HA 1004 (10 µM)	PKC e PKG	-367 ± 41 mg (72,3 ± 4,5 %)	-363 ± 22,3 mg (68,9 ± 6,5 %)	7
MDL 12,330 ^a (10 µM)	adenilato ciclase	-297 ± 22,9 mg (71,48 ± 17%)	-303 ± 28 (73,2 ± 21%)	7
ODQ (10 µM)	guanilato ciclase	-337 ± 28 (68 ± 3,78%)	-312 ± 36,6 (66,3 ± 11%)	6
KT 5720 (3 µM)	PKA	-366 ± 33 mg (71,06 ± 6,4 %)	-325 ± 31 mg (63,1 ± 6,01%)	6
KT 5823 (3 µM)	PKG	-350 ± 73 mg (67,96 ± 14,17%)	-370 ± 88 mg (71,84 ± 17%)	7

ANEXO II

Tabela 2 - Influência de diferentes drogas que interferem sobre as vias da fosfolipase C, fosfolipase A₂ proteína quinase C e PI₃ quinase, sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. As respostas estão representadas em valor absoluto (mg de tensão) ou percentagem de resposta em relação ao relaxamento causado pelo nitroprusiato de sódio 100 nM (% da resposta Max. NPS 100 nM).

Drogas (concentração M)	Inibição	Relaxamento (mg) (% Resposta Maxima ao NPS 100 nM)		N
		Antes	Depois	
U73122 (300 nM)	FLC	-310 ± 33 mg (77,16 ± 8,2 %)	-346 ± 33 (86,12 ± 8,2%)	6
Quinacrina (100 µM)	FLA ₂	-364 ± 56mg (65,0 ± 10 %)	-368 ± 42 mg (65,71 ± 7,5 %)	5
PACCOF ₃ (10 µM)	FLA ₂	-278 ± 48 mg (69,2 ± 17,5 %)	-290 ± 87 (72,1 ± 21,6 %)	6
GF 109203x (3 µM)	PKC	-317 ± 12 mg (59,8 ± 2,26 %)	-303 ± 17 (57,16 ± 3,2%)	6
Estaurosporina (100 nM)	PKC	-365 ± 54 mg (65,14 ± 18,3%)	-385 ± 50 mg (67,15 ± 13,2 %)	6

ANEXO III

Tabela 3 - Influência de diferentes drogas inibidoras da síntese protéica e de fatores de transcrição sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. As respostas estão representadas em valor absoluto (mg de tensão) ou percentagem de resposta em relação ao relaxamento causado pelo nitroprussiato de sódio 100 nM (% da resposta Max. NPS 100 nM).

Drogas (concentração M)	Inibição	Relaxamento (mg) (% Resposta Maxima ao NPS 100 nM)		N
		Antes	Depois	
Dexametasona (10 µM)	Síntese protéica e FLA ₂	-368 ± 6,5 mg (69,3 ± 1,2 %)	-480 ± 8,9 mg * (90,19 ± 1,7 %)	6
Beclometasona (10 µM)	Síntese protéica e FLA ₂	-354 ± 12,6 (21,0 ± 6,3 %)	-356 ± 13,5 (18,3 ± 5,6)	6
Wortimanina (300 nM)	PI ₃ quinase	-360 ± 41,0 mg (66,0 ± 7,52 %)	-360 ± 70,0 (66,05 ± 12,48 %)	5
SB 203580 (1 µM)	MAP quinase	-308 ± 56 mg (77,7 ± 18,3 %)	-256 ± 12 (58,19 ± 24,6 %)	5
PDTC (10 µM)	NF-κB	-368 ± 6,5 mg (70,3 ± 1,2 %)	-430 ± 9,3 mg (81,13 ± 1,75 %)	7
PD 98059 (10 µM)	MAPK	-325 ± 10,5 (61,32 ± 2,0 %)	-375 ± 9,3 (70,22 ± 1,73 %)	7

* **P < 0,01; difere significativamente do grupo controle.**

ANEXO IV

Tabela 4 - Influência de diferentes drogas bloqueadores de canais de potássio e inibidores do EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (100 nM) na traquéia isolada de cobaia com epitélio. As respostas estão representadas em valor absoluto (mg de tensão) ou percentagem de resposta em relação ao relaxamento causado pelo nitroprusiato de sódio 100 nM (% da resposta Max. NPS 100 nM).

Drogas (concentração M)	Bloqueio de canais de K ⁺ e do EDHF	Relaxamento (mg) (% Resposta Maxima ao NPS 100 nM)		N
		Antes	depois	
4- AP (1 mM)	K _v e K _{ir}	-268 ± 28,1 mg (72,8 ± 8,9%)	-312 ± 25,0 mg (84,75 ± 6,8 %)	5
Apamina (100 nM)	Small K _{Ca}	-260 ± 19,6 mg (71,2 ± 5,48 %)	-268 ± 20,0 mg (73,4 ± 5,5 %)	5
Caribdotoxina (100 nM)	Maxi-K _{Ca} e IK _{Ca}	-281 ± 12,0 mg (68,3 ± 2,9 %)	-318 ± 30,2 mg (80,26 ± 7,6 %)	5
Iberiotoxina (100 nM)	Maxi-K _{Ca}	-350 ± 17,0 mg (77,2 ± 3,8 %)	-398 ± 74,3 mg (87,8 ± 16,4 %)	5
Apamina (100 nM) + Caribdotoxina (100 nM)	EDHF	-268 ± 20,0 mg (68,5 ± 5,3 %)	-296 ± 39,4 mg (75,7 ± 9,9 %)	5

*** P < 0,001, difere significativamente do grupo controle.