

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA

**AÑÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS E
RELAXANTES INDUZIDAS PELAS CININAS NO FUNDO DE ESTÔMAGO
DE RATO E NA VESÍCULA BILIAR DE COBAIA “/TV *VITRO**”.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.
Prof. Orientador: Dr. João B. Calixto.

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

Florianópolis

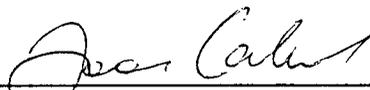
1996

**"ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DAS RESPOSTAS
CONTRÁTEIS E RELAXANTES INDUZIDAS PELAS CININAS NO
FUNDO DE ESTÔMAGO DE RATO E VESÍCULA BILIAR DE COBAIA"**

POR

DANIELA ALMEIDA CABRINI

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



Prof. Dr. João Batista Calixto



Prof Dr. Jamil Assreuy Filho



Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis, fevereiro de 1996.

*"Este andar não faz pegadas no chão, mas deixa
marcas nas alturas do buscar, do aprender, do
realizar, é renascer aquisições de existência,
acrescentar, evoluir."*

J. P.

"A única maneira de descobrir os limites do impossível está em aventurar-se um pouquinho pelos cenários do impossível."

Alexander Clarke

*Dedico esta dissertação à minha família,
principalmente aos meus pais pelo apoio e
incentivo.*

. . . e ao Adriano pelo seu amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. João Batista Calixto, pela credibilidade e estímulo ao meu trabalho e, principalmente, pelo exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Farmacologia.

Aos técnicos e funcionários do departamento, especialmente à Rosana Ostrosky, pela amizade, apoio e assessoria.

À Josane Andrada pela assessoria e paciência.

Aos colegas da pós-graduação, pela troca de informações e evolução conjunta, especialmente a Adair Santos, Alcíbia Cardozo, Elisabeth Waslawik, Monique Gevaerd, Niraldo Paulino, Vânia Ferreira e Zulma Vaz.

Aos companheiros da iniciação científica, principalmente à Maria Martha Campos, Karla Tratsk e Marcos Dias, pelo companherismo do dia a dia.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	17
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 - Fundo de estômago isolado de rato.....	18
3.1.1 - Animais.....	18
3.1.2 - Montagem da preparação.....	18
3.1.3 - Curvas concentração resposta induzidas pelas cininas.....	19
3.1.4 - Influência dos antagonistas de receptores B_1 e B_2 sobre a resposta bifásica induzida pelas cininas.....	20
3.1.5 - Efeito de diferentes classes de drogas na resposta bifásica à BK e à DABK.....	21
3.1.6 - Influência do cálcio extracelular.....	22
3.1.7 - Influência do tratamento dos animais com endotoxina de <i>Escherichia coli</i>	TI
3.2 - Vesícula biliar isolada de cobaia.....	23
3.2.1 - Animais.....	23
3.2.2 - Montagem da preparação.....	23
3.2.3 - Curvas concentração-resposta às cininas.....	24

3.2.4 - Influência do cálcio na resposta contrátil à BK.....	25
3.2.5 - Efeito dos prostanóides e da PKC na resposta contrátil à BK.....	26
3.2.6 - Efeito dos antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a resposta contrátil causada pela BK na vesícula biliar de cobaia.....	27
3.2.7 - Influência de diferentes classes de drogas sobre a resposta contrátil da BK na vesícula biliar de cobaia.....	27
3.2.8 - Curvas concentração-resposta cumulativas à DABK na vesícula biliar de cobaia.....	28
3.2.9 - Influência do cálcio e da PKC na resposta contrátil da vesícula biliar de cobaia à DABK.....	29
3.2.10 - Efeito dos prostanóides na resposta contrátil à DABK na vesícula biliar de cobaia.....	29
3.2.11 - Efeito dos antagonistas seletivos de receptores B ₁ e B ₂ sobre a resposta à DABK na vesícula biliar de cobaia.....	30
3.2.12 - Efeito do tratamento prévio dos animais com endotoxina de <i>E. coli</i>	30
3.3 - Análise estatística.....	30
3.4 - Drogas.....	31
4 - RESULTADOS.....	35
4.1 - Fundo de estômago isolado de rato.....	35

4.1.1 - Resposta bifásica induzida pela BK e demais cininas no FER.....	35
4.1.2 - Análise do antagonismo entre o HOE 140 ou des-Arg ¹ -NPC 17761 e as cininas.....	39
4.1.3 - Efeito de diversas classes de drogas sobre a resposta bifásica induzida pelas cininas no FER.....	43
4.1.4 - Influência do cálcio na resposta bifásica induzida pelas cininas no FER.....	46
4.1.5 - Efeito do pré-tratamento com LPS na resposta bifásica induzida pelas cininas no FER.....	48
4.2 - Vesícula biliar isolada de cobaia.....	50
4.2.1 - Curvas concentração-resposta à BK e peptídeos relacionados.....	50
4.2.2 - Influência do cálcio extra- e intracelular na contração induzida pela BK.....	53
4.2.3 - Influência dos inibidores e ativadores da proteína quinase C na resposta à BK naVBC.....	53
4.2.4 - Influência dos prostanóides na VBC.....	56
4.2.5 - Efeito dos antagonistas de receptores B ¹ e B ₂ na contração induzida pela BKnaVBC.....	56
4.2.6 - Efeito de diversas classes de drogas sobre a resposta contrátil induzida pela BKna VBC.....	57
4.2.7 - Efeito contrátil à DABK na VBC.....	64

4.2.8 - Influência do cálcio extracelular e da PKC sobre a resposta contrátil à DABK na VBC.....	64
4.2.9 -Influência dos prostanóides sobre a resposta contrátil à DABK na VBC.....	67
4.2.10 - Efeito dos antagonistas seletivos de receptores B ₁ e B ₂ sobre a resposta à DABK na VBC.....	67
4.2.11 - Influência do tratamento dos animais com LPS na respota contrátil à DABK na VBC.....	68
5 - DISCUSSÃO.....	74
5.1 - Fundo de estômago de rato.....	74
5.2 - Vesícula biliar de cobaia.....	87
RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Registro típico da resposta bifásica causada pela bradicinina e des-Arg ¹ -bradicinina no fundo de estômago de rato.....	37
FIGURA 2 - Resposta bifásica induzida pelas cininas no fundo de estômago de rato.....	38
FIGURA 3 - Resposta bifásica induzida pela bradicinina na presença de antagonista B ₂ no fundo de estômago de rato.....	41
FIGURA 4 - Resposta bifásica induzida pela des-Arg ¹ -bradicinina na presença de antagonista B ₁ no fundo de estômago de rato.....	42
FIGURA 5 - Registro típico da resposta bifásica causada pela bradicinina e des-Arg ¹ -bradicinina no fundo de estômago de rato na presença de inibidores de canais iônicos.....	45
FIGURA 6 - Efeito do cálcio extracelular na resposta bifásica induzida pela bradicinina e des-Arg ¹ -bradicinina no fundo de estômago de rato.....	47
FIGURA 7 - Influência do tratamento prévio dos animais com LPS na resposta bifásica induzida pela bradicinina e des-Arg ¹ -bradicinina no fundo de estômago de rato.....	49
FIGURA 8 - Efeito contrátil das cininas na vesícula biliar de cobaia.....	52
FIGURA 9 - Efeito do cálcio na resposta contrátil induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia.....	54
FIGURA 10 - Efeito da proteína quinase C na resposta contrátil induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia.....	55

FIGURA 11 - Efeito dos inibidores de prostanóides na resposta contrátil induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia.....	58
FIGURA 12 - Efeito dos inibidores da lipoxigenase e do fator de agregação plaquetária na resposta contrátil induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia.....	59
FIGURA 13 - Efeito dos prostanóides na vesícula biliar de cobaia.....	60
FIGURA 14 - Resposta contrátil da bradicinina na vesícula biliar de cobaia na presença de antagonistas do receptor B ₂	61
FIGURA 15 - Resposta contrátil da bradicinina na vesícula biliar de cobaia na presença de antagonista do receptor B _{1j}	62
FIGURA 16 - Efeito da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia em função do tempo e da síntese protéica.....	65
FIGURA 17 - Efeito do cálcio na resposta da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia.....	66
FIGURA 18 - Efeito dos inibidores de eicosanóides na resposta da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia.....	69
FIGURA 19 - Efeito dos inibidores de leucotrienos na resposta da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia.....	70
FIGURA 20 - Resposta da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia na presença de antagonistas do receptor B _{1j}	71
FIGURA 21 - Resposta da des-Arg ⁹ -bradicinina na vesícula biliar de cobaia na presença de antagonistas do receptor B ₂	72

FIGURA 22 - Influência do tratamento prévio dos animais com LPS na resposta da des-Arg [^] -bradicinina na vesícula biliar de cobaia.....	73
FIGURA 23 - Esquema proposto para explicar o mecanismo de transdução envolvido na resposta bifásica induzida pela bradicinina e des-Arg [^] -bradicinina no fundo de estômago de rato.....	86

1 - INTRODUÇÃO

As cininas bradicinina (BK) e Lys-BK (calidina) são oligopeptídeos formados endogenamente, que contêm em suas estruturas a seqüência da bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e que atuam principalmente como hormônios locais através de mecanismos autócrinos e parácrinos. As cininas podem ser encontradas em insetos, répteis, anfíbios e mamíferos.

Um dos primeiros registros a respeito das cininas foi feito por Abelous e Bardier (1909), quando observaram que após injeção intravenosa de algumas frações extraídas da urina humana ocorria queda na pressão arterial no homem. Tal efeito foi atribuído, na ocasião, a um hormônio circulante e que não seria produzido nos rins. Na busca do local onde este hormônio estaria sendo produzido, Kraut *et al* (1930) localizaram no pâncreas uma substância com o mesmo princípio hipotensor descrito por Abelous e Bardier (1909), que denominaram de calicreína. Werle *et al* (1937) observaram que quando a calicreína era incubada no plasma, liberava uma potente substância estimuladora do músculo liso, sendo que esta substância liberada não era produto da quebra da calicreína, mas sim, o produto da quebra de uma proteína plasmática. Este produto foi denominado calidina e sugeriram o nome calidínogênio para o seu precursor protéico inativo presente no plasma (Werle e Berek, 1948). Os autores concluíram que a calidina, substância

farmacologicamente ativa, era liberada de um precursor através da ação proteolítica da enzima calicreína. Alguns anos depois, Rocha e Silva e colaboradores (1949), no Brasil, descobriram que o plasma de cão incubado com venenos de certos tipos de cobras ou com tripsina, causava, quando injetado intravenosamente, diminuição da pressão arterial de cão, além de causar contração lenta no íleo de cobaia *in vitro*. Devido à esta contração lenta causada no íleo, os autores denominaram esse polipeptídeo de bradicinina, palavra derivada do grego *kineo*, mover, e *bradys*, lento. Posteriormente, Werle e Maier (1952) observaram que a BK e a calidina eram formadas em condições similares e apresentavam as mesmas ações farmacológicas, o que levou os autores a suporem que ambas estavam altamente relacionadas e que derivavam do mesmo substrato. A confirmação dessa proposta veio em 1960, quando Elliot *et al.* isolaram a BK formada pela reação da tripsina com a globulina, e o peptídeo foi finalmente sintetizado por Boissonnas *et al.* (1960). Com a disponibilidade da BK sintética, inúmeros trabalhos passaram a relatar as importantes ações mediadas por esse peptídeo.

As cininas são formadas em vários órgãos e podem ser detectadas em secreções (urina, saliva, suor), fluido intersticial e, sob algumas circunstâncias (inibidores da cininase), no sangue. A meia-vida sistêmica das cininas é bastante pequena (15 a 30 segundos), portanto a sua concentração nos fluidos biológicos

também é baixa (cerca de 10^{-11} mol/l) (Sharma e Buchanan, 1994). As cininas são formadas a partir de diversos cininogênios, que podem ser α -globulinas de alto (626 aa, 88 a 120 kD) ou de baixo peso molecular (409 aa, 50 a 68 kD) (Hall, 1992; Margolius, 1995), por ação de enzimas formadoras de cininas, as cininogenases. A cininogenase mais conhecida é a calicreína (Carretero e Scicli, 1991; Bhoola *et al.*, 1992; Carretero *et al.*, 1993). As calicreínas podem ser de dois tipos: plasmática e tecidual, as quais diferem entre si quanto ao peso molecular, origem, propriedades bioquímicas e ações farmacológicas sobre o cininogênio. Um único gene codifica a calicreína plasmática (Schachter, 1980). As calicreínas teciduais são glicoproteínas ácidas, produtos de uma família de gens que são em número de 3 na espécie humana, mais de 20 no rato e 24 no camundongo. Os gens são expressos em diversas células epiteliais ou secretórias, incluindo glândula salivar, pâncreas, próstata, intestino e néfiron distal, além de também existir em neutrófilos. A calicreína circula na forma inativa, a pré-calicreína (zimogênio) (Margolius, 1995). Ainda não são conhecidos os fatores que estimulam a produção de calicreína ou como esta é armazenada. A calicreína plasmática é uma proteinase sérica diferente da calicreína tecidual, mas que carrega o mesmo nome (Bhoola *et al.*, 1992).

A pré-calicreína (fator de Fletcher) encontrada no plasma pode ser ativada por ação do fator de Hageman ativado (Mandle *et al.*, 1976; Kaplan *et al.*, 1992). A

ativação do fator de Hageman está relacionada com a estimulação de um grande número de enzimas proteolíticas que circulam como precursores inativos e levam a um complexo de mecanismos reativos, dos quais os mais proeminentes são: coagulação sanguínea, fibrinólise, formação de cininas plasmáticas e reações envolvendo complemento (Regoli e Barabé, 1980). Quando o sistema é ativado, inicia-se a formação de trombos junto com a liberação de cininas nas superfícies endotelial e subendotelial (Burch *et al.*, 1990). O fator de Hageman inativo pode ser estimulado por ação da calicreína através de uma reação de feedback positivo (Cochrane *et al.*, 1973). A calicreína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular liberando BK, enquanto que a calicreína tecidual libera calidina atuando sobre o cininogênio de alto e de baixo peso molecular (Jacobsen, 1966; Pierce e Guimarães, 1977). As cininas formadas no plasma difundem-se através das paredes capilares ou via sistema linfático para os tecidos e são rapidamente inativadas pelas diversas cininases contidas no plasma e nos tecidos (Farmer e Burch, 1991; Burch *et al.*, 1993). Há enzimas no sangue que atuam na porção N terminal das cininas, convertendo a Met-Lys-BK (cinina liberada somente em condições ácidas e *in vivo*) em Lys-BK e esta em BK, denominadas aminopeptidases. A tripsina também atua dessa mesma forma, porém esta enzima é ativa somente em condições especiais e pode converter apenas uma pequena fração de Lys-BK em BK (Regoli e Barabé, 1980; Linz *et al.*, 1995). Uma vez que essas

duas classes de enzimas, aminopeptidases e tripsina, não são ativas contra a BK, presume-se que as enzimas que atuam na porção N terminal não têm papel importante no processo de inativação das cininas. As enzimas mais importantes envolvidas na degradação das cininas são aquelas que atuam na porção C terminal das cininas, chamadas cininases. Estas enzimas são encontradas no sangue, nas células endoteliais e outros tecidos (Campbell *et ai*, 1993). As principais cininases são: cininase I, cininase II e encefalinases. As cininases I também são conhecidas como carboxipeptidases M (plasma sanguíneo) e N (membranas), as quais removem do terminal C o aminoácido arginina (Arg) formando a des-Arg[^]-BK (DABK) e a Lys-des-Arg[^]-BK (des-Arg[^]-calidina) (Lys-DABK) (Regoli e Barabé, 1980; Marceau, 1995). As cininas são predominantemente metabolizadas por enzimas que são idênticas à enzima conversora da angiotensina I (EGA) ou cininase II (Erdős, 1990). Essas enzimas removem o dipeptídio do terminal C, resultando na completa inativação das cininas. As encefalinases são endopeptidases neutras, as quais apresentam a mesma atividade que a cininase II (Marceau, 1995; Linz *et al.*, 1995; Margolius, 1995). A cininase II tem maior afinidade pela BK e Lys-BK do que a cininase I, sugerindo que, provavelmente, a formação dos metabólitos ativos des-Arg[^], provavelmente não ocorre *in vivo* sob condições fisiológicas (Marceau, 1995). Assim, a formação da DABK foi observada apenas no exsudato inflamatório, onde a formação de fibrina, aumenta a

atividade da cininase I, sendo que esta última passa a predominar sobre a cininase II (Campbell *et ai*, 1990). Este procedimento está bastante estudado no exsudato nasal, onde a Lys-BK é a cinina predominante que sofre ação das carboxipeptidases, as quais atuam sobre a Lys-BK dando origem à BK ou Lys-DABK e/ou DABK. Este último metabólito ativo é o mais estável no exsudato inflamatório (Proud *et ai*, 1987; Baranuik *etal.*, 1990).

Quando formadas, as cininas, incluindo a BK, participam de diversos processos fisiopatológicos, tais como a regulação da pressão arterial, o controle do tônus da musculatura lisa do trato gastrintestinal e das vias aéreas, na produção da dor, reações alérgicas e em vários estados relacionados aos processos inflamatórios, tanto agudos quanto crônicos, como a rinite, a asma, a gota, o choque séptico, a pancreatite entre outros (ver para revisão: Regoli e Barabé, 1980; Proud e Kaplan, 1988; Burch *et al*, 1990; Steranka e Burch, 1991; Bhoola *et al*, 1992; Hall, 1992; Dray e Perkins, 1993). As cininas são conhecidas por causar potente efeito vasoativo, promovendo dilatação venular e aumento da permeabilidade vascular, causando também mudanças vasculares resultando em enxaqueca, infarte do miocárdio, síndrome carcinóide e síndrome de hiperbradicinismo. O efeito predominante das cininas na circulação sugere um possível papel no controle do sistema cardiovascular, atuando como agentes protetores contra hipertensão (Regoli e Barabé, 1980; Wang *et al*, 1991). É também conhecido que os níveis plasmáticos

de BK e de seus principais metabólitos, a DABK e a Lys-DABK, estão aumentados em vários processos inflamatórios (Regoli e Barabé, 1980; Hargreaves *et al.*, 1988; Damas *et al.*, 1990). Além disso, a injeção de BK produz dor pela ativação e/ou sensibilização de fibras aferentes nociceptivas do tipo A δ e C (Collier e Lee, 1963; Franz e Mense, 1975; Szolcsányi, 1987). A BK pode também modular a neurotransmissão autonômica para alguns neurotransmissores em vários músculos lisos (Zetler e Kampmann, 1979; Huidobro-Toro *et al.*, 1986; Llona *et al.*, 1987, Acevedo *et al.*, 1990; Llona *et al.*, 1991).

As cininas medeiam um grande número de processos através da estimulação dos receptores próprios de membrana (Regoli e Barabé, 1980; Marceau *et al.*, 1983; Proud e Kaplan, 1988; Bhoola *et al.*, 1992; Regoli *et al.*, 1993; Marceau, 1995). A classificação mais aceita atualmente quanto aos tipos de receptores para as cininas é aquela proposta por Regoli e Barabé (1980), ou seja, existem dois tipos de receptores, B₁ e B₂. Essas evidências foram baseadas inicialmente em estudos utilizando agonistas e antagonistas seletivos das cininas e foram confirmados recentemente com estudos de binding e finalmente com a clonagem dos dois receptores (McEarchem *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992; Menke *et al.*, 1994; Macneil *et al.*, 1995). Entretanto, existem trabalhos sugerindo a existência de outros subtipos de receptores para as cininas, como Saha *et al.* (1990, 1991) que propõe que as respostas contráteis e relaxantes causadas pela BK no

esôfago de gambá seriam mediadas através da estimulação de receptores B₃, B₄ e B₅. Regoli *et al.* (1993), com base em estudos farmacológicos, sugeriram a existência de subtipos de receptores B₂; o subtipo B_{2A} estaria presente no coelho, cão e possivelmente no homem, enquanto o receptor B_{2B} seria encontrado na cobaia, camundongo e rato. Atualmente essas hipóteses sugerindo a existência de subtipos de receptores obtidos principalmente com o uso de antagonistas, foram descartadas, considerando que as diferenças observadas decorrem sobretudo de composições distintas de receptores B₂ existentes entre as espécies estudadas (Hall *et al.*, 1993).

Os receptores B_j são mais sensíveis aos metabólitos originados da ação da cininase I, a DABK e a Lys-DABK. Tais metabólitos foram considerados inativos até que Erdős e Sloane (1962) demonstraram suas atividades biológicas. A partir de então, surgiu a idéia de que os fragmentos das cininas sem o terminal C arginina estariam envolvidos em condições fisiológicas e patofisiológicas, atuando como ligantes endógenos dos receptores B_j. A expressão dos receptores B_j parece estar restrita a alguns tecidos, como por exemplo músculos lisos vasculares (arterial e venoso). Em uma preparação típica contendo receptores B_i, foi observado que na presença do inibidor da cininase I, o ácido DL-2-mercaptometil-3-guanidinoetiltiopropiônico (mergetpa), a resposta à BK era significativamente reduzida, sugerindo que a ação da BK nos receptores B_j nesta preparação deve-se

principalmente à sua conversão em seu metabólito ativo, a DABK (Barbiuk *et al.*, 1982; Regoli *et al.*, 1986). Estudos funcionais e bioquímicos demonstraram que, na preparação de aorta de coelho, a DABK é cerca de 10 vezes mais potente do que a.BK e a Lys-DABK é acima de 10 vezes mais potente em relação à Lys-BK. Curiosamente, esses metabólitos não apresentaram qualquer efeito em outras preparações clássicas como íleo de gato e de cobaia e útero de rato (Suzuki *et al.*, 1969; Barabé *et al.*, 1977), ou seja, são inativos em preparações que só apresentam receptores B₂. Na maioria das vezes, o efeito mediado pelo receptor B₁ é uma contração no músculo liso, apesar de que algumas vezes ele pode causar relaxamento como na artéria mesentérica de coelho (Churchill e Ward, 1986) e na artéria renal de cão (Rhaleb *et al.*, 1989). Com o surgimento dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ baseados na estrutura da DABK, foi possível a comprovação quanto à classificação dos receptores B₁ em algumas preparações. Regoli e colaboradores mostraram que a substituição da posição oito na estrutura da DABK pela leucina resultou em um antagonista de alta afinidade (des-Arg⁸-[Leu⁸]-BK) para os receptores B₁, apresentando valor de pA₂ de 6,75 na aorta de coelho. A des-Arg⁸-[Leu⁹]-BK mostrou-se inativa em receptores B₂ (Regoli *et al.*, 1990), e até hoje permanece como o antagonista de receptores B₁ mais utilizado, apesar de existirem outros como a Lys-des-Arg⁹⁻⁸-[Leu]-BK. Os receptores B₁ têm localização restrita, sendo que muitas vezes co-existem com os receptores B₂. Os

receptores B₁ também podem ser expressos em culturas de células e outros tecidos de ratos, camundongos, suínos, bovinos e humanos. Além disso, eles foram também demonstrados *in vivo*. Contudo, não há qualquer registro de receptores B₁ em cobaias (Hall, 1992; Marceau, 1995).

Os receptores B₁ apresentam uma característica própria, ou seja, a capacidade de serem induzidos após longo período de incubação *in vitro*, após lesão tecidual ou na presença de certos processos inflamatórios. Tais efeitos são mais facilmente observados em experimentos *in vitro*, onde a maioria das preparações sensíveis à DABK não respondem ao peptídeo nas primeiras horas de incubação, sendo que as respostas aparecem gradualmente após algumas horas. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez na veia mesentérica anterior isolada de coelho, onde a DABK induz contração, sendo que esse efeito era inexistente no início dos experimentos, mas aumentava gradativamente com o tempo de incubação *in vitro*, ocorrendo a resposta máxima 6 h após (Regoli *et al.*, 1978). Este aumento da resposta dos receptores B₁ *in vitro* é totalmente inibido após incubação prévia das preparações com inibidores da síntese protéica, incluindo a cicloheximida, não apenas nesta preparação mas também nas demais onde o receptor B¹ apresenta as mesmas características (Regoli *et al.*, 1978; Marceau *et al.*, 1980; Whaley *et al.*, 1983; Bouthillier *et al.*, 1987; deBlois *et al.*, 1988, 1991; Campos e Calixto, 1994). Esse efeito está bastante estudado na aorta isolada de

coelho e, ao que se sabe, o aumento da resposta mediada por receptores B₂ requer a ativação de um ou mais genes, além da expressão do RNAm(s); translocação a nível dos ribossomos e transporte da proteína do retículo endoplasmático ao aparelho de Golgi (para revisão ver Marceau, 1995). No caso do receptor B₂ também estar presente junto com o receptor B₁, no processo de indução dos receptores B₂, as respostas mediadas pelo receptor B₂ muitas vezes permanecem inalteradas (Marceau *et al.*, 1980; Campos e Calixto, 1994) ou podem sofrer diminuição (Campos e Calixto, 1995). O aumento da resposta do receptor B₁ *in vivo* é bem caracterizada por um método de indução do processo inflamatório através da injeção intravenosa contendo uma dose subletal de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) em coelhos. Cinco horas após a injeção de LPS, a injeção intra-arterial de DABK ou de Lys-DABK exógenas, determinam hipotensão dose-dependente, sendo que os animais controle não respondem à DABK ou à Lys-DABK (Marceau *et al.*, 1983). Além disso, foi também demonstrado que alguns músculos lisos removidos dos animais tratados previamente com LPS, como os tecidos vasculares, apresentaram resposta contrátil à DABK na primeira hora de incubação *in vitro*, sugerindo que esta resposta foi adquirida *in vivo* antes do sacrifício do animal (Regoli *et al.*, 1981; Sugihara *et al.*, 1991). Por outro lado, outras substâncias também induzem aumento da resposta aos receptores B₂, como por exemplo o dipeptídeo muramil (MDP) (Marceau *et al.*, 1984; Boutillier *et al.*

1987), algumas citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β) ou IL-2, ambos também demonstrados na aorta de coelho (deBlois *et al.*, 1988; 1989). Após diversos estudos na preparação da aorta de coelho, deBlois *et al.* (1991) sugeriram o envolvimento das citocinas no processo de indução dos receptores B $_2$, sendo que a sensibilização espontânea às cininas pode ser dependente da produção local de interleucina. Isso se deve ao fato que todos os estimulantes mencionados acima (LPS, MDP, IL-1 e IL-2) induzirem a síntese de IL-1 em diversos tipos celulares. Entretanto, a indução espontânea de receptores B $_1$ não é inibida por antagonistas das citocinas, como o antagonista do receptor da IL-1 (IRA) na aorta isolada de coelho (Petitclerc *et al.*, 1992). Esse efeito do aumento da resposta aos receptores B $_1$ também já foi demonstrado em outros modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hall, 1992; Marceau, 1995; Campos e Calixto, 1995; Campos *et al.*, 1995; 1996).

Está atualmente bem estabelecido que os receptores B $_2$ medeiam a maioria das ações das cininas sob condições fisiológicas. São ativados tanto pela BK como pela Lys-BK, as quais são equipotentes, enquanto que os metabólitos ativos da cininase I são inativos nestes receptores. Esses receptores medeiam a contração induzida pela BK no útero de rato e no íleo da gato (Barabé *et al.*, 1977), além disso são constitutivos e estão, de maneira geral, amplamente distribuídos no organismo, podendo ser localizados em tecidos de várias espécies animais, tanto a

nível central quanto periférico. A BK tem diversos efeitos nas fibras autonômicas eferentes e sensoriais, incluindo despolarização de membrana plasmática e modulação da liberação do neurotransmissor, efeitos esses mediados pelos receptores B₂ (Steranka *et al.*, 1988). Sua caracterização por muito tempo foi realizada utilizando-se agonistas e antagonistas seletivos, assim como para o receptor B₁. O primeiro antagonista seletivo desenvolvido para os receptores B₂ foi o [D-Phe¹]-BK (Vavrek e Stewart, 1985). Outros antagonistas seletivos mais potentes surgiram, como por exemplo o HOE 140, que apresenta alta seletividade para os receptores B₂, sendo ativo tanto *in vitro* como *in vivo* (Lembeck *et al.*, 1991; Hock *et al.*, 1991; Wirth *et al.*, 1991). O primeiro antagonista B₂ não-peptídico, o WIN 64338, também mostrou-se bastante seletivo (Sawutz *et al.*, 1994). Embora estudos bioquímicos e farmacológicos tenham sugerido a existência de subtipos de receptores B₂ (ver para revisão: Hall, 1992; Farmer e Burch, 1992), dados recentes indicam que essas diferenças de ação parecem estar relacionadas principalmente com pequenas variações existentes nesses receptores entre as várias espécies estudadas, evidenciadas principalmente com relação à potência de antagonistas (Hall *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1994).

Com o emprego de técnicas de biologia molecular foi possível confirmar, até o momento, a presença de apenas dois tipos de receptores para as cininas, B₁ e B₂. Os estudos de binding auxiliaram na caracterização dos dois receptores como

sendo moléculas distintas. Os receptores B_1 foram clonados recentemente em fibroblastos humanos e em células de aorta de coelho (Menke *et al.*, 1994; Macneil *et al.*, 1995), enquanto que os receptores B_2 foram clonados em diversos tecidos de várias espécies animais, como no camundongo, rato e humano (McEachem *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992; Eggerikx *et al.*, 1992; Powell *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1994;). Tanto os receptores B_1 como os B_2 pertencem à família de receptores que apresentam 7 unidades transmembrana reguladas pelas proteínas G. Os receptores B_1 e B_2 humanos apresentam 36% de homologia entre si (Menke *et al.*, 1994), sendo o receptor B_1 (353 aa) um pouco menor do que o B_2 (364 aa) (Webb *et al.*, 1994). O receptor B_1 de rato é composto de 366 aa com peso molecular de 41,7 KD e está acoplado à ativação da fosfolipase C. Hess *et al.* (1992) clonaram e caracterizaram farmacologicamente o gen do receptor B_2 humano em linhagem celular de fibroblastos pulmonares, e a proteína apresenta 81% de semelhança com o receptor B_2 de rato descrito por McEachem *et al.* (1991). Os receptores B_2 apresentam três sítios de glicosilação, bem como sítios de fosforilação para as proteínas quinase A e quinase C (PKA e PKC) (Hall, 1992). Além disso, sua seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies já estudadas. A expressão dos receptores B_2 por um único gene foi confirmada no trabalho realizado por Borkowski *et al.* (1995) onde eles produziram uma linhagem de camundongos em que o gene para o receptor B_2 foi deletado. A

inativação do gen foi capaz de inibir completamente o aparecimento dos receptores B₂, o que foi comprovado através de análise genética, bioquímica e farmacológica, sendo que esses animais não apresentaram quaisquer alterações fisiológicas aparentes. Já os receptores B₁, tanto humano (Menke *et al.*, 1994) como de coelho (Macneil *et al.*, 1995) apresentaram 78% de homologia entre si e, assim como o receptor B₂, apresentam 3 sítios de glicosilação, além de sítios de fosforilação para aPKAePKC.

Entretanto, os segundos mensageiros intracelulares envolvidos nas respostas das cininas são complexos e, na maioria dos casos, são pouco conhecidos. Estudos bioquímicos demonstraram que a estimulação dos receptores para as cininas está ligada à maioria dos sistemas de segundos mensageiros já identificados, com exceção do AMPc. Sendo assim, o sistema efetor ativado em um determinado tecido vai depender de quais enzimas ou canais acoplados aos receptores presentes. A maior parte das respostas mediadas por ambos receptores envolve a ativação da fosfolipase C que, como resultado, aumentam os níveis do inositol trifosfato (IP₃) e do diacilglicerol. Enquanto o IP₃ libera Ca⁺⁺ intracelular do retículo sarcoplasmático, o diacilglicerol ativa diretamente a PKC (Hall, 1992; Farmer e Burch, 1992; Burch *et al.*, 1993). Em inúmeros casos podem estar acoplados à fosfolipase A₂, estimulando dessa maneira, a produção de eicosanóides, ou, ainda, podem ativar a produção de óxido nítrico, aumentando.

assim, indiretamente os níveis de GMPc ou AMPc. Além disso, podem estar acoplados a canais iônicos, como por exemplo os canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis à voltagem. Em alguns casos a resposta à BK pode envolver a ativação de canais de K^{+} ativados por Ca^{2+} , resultando assim na hiperpolarização da membrana. Também já foi demonstrado que, em células epiteliais de pulmão de fúria, a ativação do receptor da bradicinina ativa um tipo de receptor para a rianodina, denominado P4 (Giannini *et al.*, 1992).

Entre os vários efeitos mais conhecidos das cininas, são característicos aqueles observados no trato gastrointestinal. Calixto e Medeiros (1992a) demonstraram que a BK e a DABK causam resposta bifásica no fundo de estômago isolado de rato, ou seja, relaxamento seguido de contração. O relaxamento é dependente da mucosa e, a resposta à DABK, mas não a da BK, é totalmente inibida na presença da des-Arg⁹⁻⁸-[Leu]-BK, antagonista seletivo de receptores B₁. Já na vesícula biliar de cobaia, foi demonstrado que a BK causa aumento da secreção de bicarbonato, principalmente através da liberação de PGE₂ (Baird e Margolius, 1989). Sabendo-se que as cininas desempenham papel importante nos processos inflamatórios, além de seus fisiológicos, tomam-se necessários mais estudos a respeito do mecanismo de ação desses peptídeos sobre o trato gastrointestinal, essencial para a compreensão do envolvimento das cininas principalmente nos processos patológicos.

2 - OBJETIVOS

O presente estudo foi realizado com o objetivo de:

1. Caracterizar com o auxílio de agonistas e antagonistas seletivos para receptores B_1 e B_2 para as cininas os subtipos de receptores envolvidos na resposta contrátil e relaxante para as cininas na musculatura lisa do fundo de estômago de rato e na vesícula biliar de cobaia *in vitro*.

2. Investigar com o emprego de antagonistas específicos de vários receptores, antagonistas de canais iônicos e de sistema de transdução intracelular, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes para as cininas nestas duas preparações.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Fundo de estômago isolado de rato.

3.1.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 a 300 g, criados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 hs, com a temperatura constante de 23 ± 2 °C e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

3.1.2 - Montagem da preparação

Após leve anestesia com éter, foi feita a secção dos vasos sanguíneos cervicais dos animais e a cavidade abdominal foi exposta e o estômago removido. Após lavar em solução de Krebs-Henseleit, a porção referente ao fundo do estômago foi separada, do qual, normalmente, eram retirados dois fragmentos do músculo longitudinal do fundo do estômago de cada animal, cada qual medindo cerca de 2 a 3 mm de largura e 15 a 20 mm de comprimento. As preparações foram montadas em cubas para órgão isolado contendo 5 ml da solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 113; KCl 4,7; $CaCl^2$ 2,5; $NaHCO_3$ 25; $MgSO_4$ 1,1; KH_2PO_4 0,9 e glicose 11 (pH = 7,2 mantida à 37 °C, continuamente borbulhada com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂) (Calixto e Medeiros,

1992a). As preparações foram submetidas à tensão basal de Ig e permaneceram em equilíbrio por, no mínimo, 60 min antes da adição de qualquer droga. Durante o período de equilíbrio, a solução nutritiva foi renovada a cada 20 min. As mudanças na tensão isométrica foram registradas por transdutores de força F-60 (Narco Biosystem ou Leticia 6006). Todos os experimentos foram sempre realizados na presença de captopril (3 μ M) a fim de evitar degradação das cininas pela cininase

II. As respostas contráteis ou relaxantes induzidas pelo agonista foram expressas como a média de tensão \pm erro padrão da média (E.P.M.), relativa ao tônus induzido previamente pelo BaCl₂ (300 μ M).

3.1.3 - Curvas concentração-resposta induzidas pelas cininas

Na tentativa de estabelecer a ordem de potência para BK e análogos, foram construídas curvas concentração-resposta (CCR) simples para BK, Met-Lis-BK, Tir₈-BK, Hip3-BK e DABK (100 pM a 1 μ M), em preparações pré-contraídas com BaCl₂ (300 μ M). Apenas uma única curva completa para cada agonista foi obtida em cada órgão, e a exposição a cada concentração do agonista restringia-se de 3 a 5 min, com renovação do líquido nutritivo e com 20 min de intervalo entre cada dose.

3.1.4 - Influência dos antagonistas de receptores B₁ e B₂ sobre a resposta bifásica induzida pelas cíninas

Em outra série de experimentos, após o período de equilíbrio, foram obtidas CCR completas à BK ou à DABK (100 pM a 3 p.M) na ausência ou na presença de HOE 140 (3 a 30 nM), antagonista B₂, ou des-Arg⁸-NPC 17761 (10 nM a 1 μM), antagonista B₁, em preparações pre-contráidas com BaCl₂ (300 μM). Os antagonistas foram adicionados à preparação 10 min antes do agonista. Apenas uma única CCR completa ao agonista foi realizada em cada preparação. Com a intenção de corrigir eventuais alterações nas preparações no decorrer do experimento, em outras preparações foram realizadas CCR aos agonistas na presença do veículo no qual foi diluído o antagonista (solução salina tamponada, PBS).

Quando possível, foram calculados os valores aparentes de pA₂ (isto é, o co-logaritmo da constante de dissociação de equilíbrio do antagonista, ou seja, do seu “K_b”) para cada antagonista de acordo com o método proposto por Schild e para isto foram utilizados diferentes concentrações dos antagonistas. O log (DR - 1) foi projetado contra o log [B], onde os DR representam as razões entre os valores das CE⁵⁰s na presença do antagonista e da CE⁵⁰ controle (na ausência do antagonista) menos 1, enquanto [B] representa a concentração molar do antagonista (Arunlakshana e Schild, 1959). O antagonismo foi considerado de

natureza competitiva simples quando o coeficiente angular da reta de regressão linear obtida pelo método de Schild não diferiu significativamente da unidade (Kenakin, 1993).

3.1.5 - Efeito de diferentes classes de drogas na resposta bifásica à BK e à DABK

Para avaliar alguns dos mecanismos envolvidos na resposta bifásica à BK e à DABK no FER, em outra série de experimentos, após a obtenção de respostas estáveis para uma única concentração de BK ou DABK (100 nM), nos tecidos pré-contráídos com BaCl₂ (300 μM), as preparações foram pré-incubadas com uma das seguintes drogas, adicionadas ao banho de 10 a 30 min antes, e novas respostas foram obtidas em suas presenças: apamina (bloqueador de canais de K⁺ ativados por Ca²⁺, 1 μM); forbol éster (ativador da PKC, 1 μM); estaurosporina (inibidor da PKC, 10 nM); nicardipina (antagonista de canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L, 1 μM); cloreto de níquel (NiCl₂, antagonista de canais de Ca²⁺ do tipo T, 300 μM), N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) e N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG) (inibidores da óxido nítrico sintetase, 100 μM), azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel, 10 μM), pirlamina (antagonista de receptores histaminérgicos H₁, 1 μM), cimetidina (antagonista de receptores histaminérgicos H₂, 100 nM), metisergida (antagonista não-seletivo de receptores serotoninérgicos, 100 nM), hexametônio (antagonista nicotínico, 100 μM), WEB 2086 (antagonista do receptor do fator de agregação plaquetária, 100 nM), FK 888

(antagonista de receptor NK¹, 1 μM), SR 48968 (antagonista de receptor BK₂, 1 μM), MK 571 (antagonista de receptores para leucotrieno D₄ e E₄ (LTD⁴ e LTE⁴), 100 nM), BW 755c (inibidor da ciclo- e lipoxigenase, 10 μM), tetraetilamônio (bloqueador ganglionar, 10 μM), fragmento 1-37 do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (antagonista do receptor de CGRP, 1 μM) e [D-P-CI-Phe¹, Leu⁵]-peptídeo intestinal vasoativo (antagonista do receptor VIP, 1 μM), e novas respostas foram obtidas em suas presenças.

3.1.6 - Influência do cálcio extracelular

Com o objetivo de estudar a contribuição do Ca²⁺ extracelular na resposta bifásica induzida pela BK ou pela DABK no FER pré-contraído com carbacol (10 a 30 nM), que foi utilizado no lugar do BaCl₂ porque a sua contração é mais resistente em meio sem Ca²⁺, por utilizar principalmente Ca dos estoques intracelulares. Após a obtenção de duas respostas bifásicas controle reproduzíveis para ambos os peptídeos nas preparações mantidas em solução de Krebs normal, usado para induzir tônus, foram transferidas para solução sem Ca²⁺ mais EGTA (1 mM) e diversas respostas aos peptídeos foram obtidas em meio sem Ca²⁺.

3.1.7 - Influência do tratamento dos animais com endotoxina de *Escherichia coli*

Para analisar se as respostas mediadas pelos receptores BK no FER podem ser influenciadas pelo tratamento com LPS, em um outro grupo experimental, os animais foram tratados com endotoxina de *E. coli* (LPS, 10 μg/animal, i.v.) 24 h

antes dos experimentos. As preparações foram montadas como descrito anteriormente e, após a pré-contracção com BaCl_2 (300 μM), CCR simples foram obtidas para a BK ou para a DABK (100 pM a 1 μM) e foram comparadas com as obtidas em preparações oriundas de animais controle (tratados com salina).

3.2 - Vesícula biliar isolada de cobaia

3.2.1 - Animais

Foram utilizadas cobaias de ambos os sexos (300 - 400 g) criadas no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em temperatura ambiente com ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração, vegetais frescos e água.

3.2.2 - Montagem da preparação

Após anestesia com éter, os animais foram sacrificados com golpe na cabeça seguido de deslocamento cervical, e tiveram a cavidade abdominal exposta e a vesícula biliar foi removida. Após lavar em solução de Krebs-Henseleit, a vesícula biliar foi dividida, normalmente, em 4 tiras (3 a 4 mm de largura por 10 a 15 mm de comprimento). Cada preparação foi colocada em uma cuba para órgão isolado contendo 5 ml da solução de Krebs-Henseleit (composição (mM): NaCl 113; KCl 4,7; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; MgSO_4 1,1; KH_2PO_4 0,9 e glicose 11), mantida em $\text{pH} = 7,2$ à 37°C , continuamente oxigenada com 95 % de O_2 e 5 % de CO_2 . As mudanças na tensão isométrica foram registradas por meio de

transdutores de força F-60 (Narco Biosystem ou Letica 6006), sob tensão basal contínua de 0,5 g. As preparações permaneceram em equilíbrio por, no mínimo, 2 h antes da adição de qualquer droga, durante a qual a solução nutritiva foi renovada a cada 20 min. Todos os experimentos foram realizados na presença de captopril (3 μ M) para evitar a ação da cininase II. As respostas contráteis induzidas pelos agonistas foram expressas em gramas de tensão \pm E.P.M..

3.2.3 - Curvas concentração-resposta às cininas

Após o período de equilíbrio de duas horas, e com a intenção de confirmar a viabilidade dos tecidos, as preparações foram expostas ao cloreto de potássio (KCl 80 mM, preparado por substituição equimolar do NaCl 74,4 mM por KCl) como estímulo padrão. Após a lavagem, as preparações foram novamente colocadas em solução normal e após o retomo à linha de base (cerca de 30 min), foram construídas CCRs à BK e análogos. As CCRs completas para todos os agonistas foram realizadas com base no método cumulativo (Van Rossum, 1963). Cada nova concentração do agonista era adicionada somente quando o efeito da última concentração havia se estabilizado. Para verificar a ocorrência de dessensibilização na contração induzida por BK na vesícula biliar de cobaia, em experimentos iniciais (n = 5) foram realizadas várias CCRs consecutivas à BK (1 pM à 10 μ M) na mesma preparação a intervalos de 60 min de intervalo entre cada curva. Assim, foram construídas curvas CCRs aos 30, 60 e 120 min após o período

de equilíbrio das preparações. Como não foi observada dessensibilização significativa em duas curvas consecutivas para a BK, não foram realizadas mais do que duas CCRs completas à BK ou peptídeos relacionados, na mesma preparação. Cada preparação foi exposta a um único agonista.

3.2.4 - Influência do cálcio na resposta contrátil à BK

Para confirmar o possível envolvimento do Ca^{2+} extracelular na contração induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia, decorridas duas horas de equilíbrio, as preparações foram transferidas para solução de Krebs sem Ca^{2+} contendo 1 mM de EGTA, onde permaneceram por cerca de 20 min. Durante esse período, a solução foi renovada a cada 5 min. Após este período, as preparações foram mantidas em solução sem Ca^{2+} por 10 min e foram então obtidas CCRs à BK (0,1 pM a 10 μ M). Em outra série de experimentos as preparações foram incubadas durante 20 min com rianodina (alcalóide que interfere com os canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, 10 μ M) e uma nova CCR completa para à BK foi obtida em solução sem Ca^{2+} e na presença de rianodina (10 μ M). Em outro grupo experimental, as preparações de vesícula biliar de cobaia permaneceram em equilíbrio por 2 h em Krebs normal. Logo após foram obtidas CCRs à BK na ausência ou na presença de nicardipina (inibidor de canal de Ca^{2+} do tipo L, 1 μ M), incubada 20 min antes.

3.2.5 - Efeito dos prostanóides e da PKC na resposta contrátil à BK

Com o objetivo de investigar o possível envolvimento de prostanóides na resposta contrátil induzida pela BK em vesícula biliar de cobaia, seguindo o período de equilíbrio de 2 h, foram obtidas CCRs à BK (0,1 pM a 10 μ M) na ausência ou na presença das seguintes drogas adicionadas ao banho 20 min antes da adição da BK: indometacina (3 μ M), ibuprofeno (30 μ M) (ambos inibidores da cicloxigenase), fenidona (inibidor da lipoxigenase, 30 μ M), dazoxiben (inibidor do tromboxano (TXA_2)-sintase, 30 nM) ou MK 571 (antagonista seletivo do receptor de LTD⁴ e LTE₄, 100 nM). Em um outro grupo de experimentos, foram realizadas CCRs para a prostaglandina E₂ (PGE₂, 0,1 nM a 100 μ M), prostaglandina p_{2a} (PGF₂^α, 0,1 nM a 100 μ M) ou para o tromboxanomimético, U46619 (100 pM a 1 pM), utilizando o método cumulativo. Para evitar dessensibilização, foi realizada apenas uma única CCR para cada agonista por preparação.

O possível papel da PKC sobre a resposta contrátil da vesícula biliar de cobaia à BK foi também investigado, analisando-se os efeitos da estaurosporina (0,1 μ M) e H-7 (3 μ M) (dois antagonistas da PKC) ou do forbol éster (ativador da PKC, 1 μ M). As drogas foram adicionadas às preparações 30 min antes da construção das CCR à BK, exceto o forbol éster, adicionado 60 min antes da BK.

3.2.6 - Efeito dos antagonistas dos receptores B₁ e B₂ sobre a resposta contrátil causada pela BK na vesícula biliar de cobaia

Seguindo-se as 2 h de equilíbrio das preparações, foram obtidas CCR à BK (0,1 pM a 10 μM) na ausência ou na presença do HOE 140, NPC 17761 ou NPC 17731 (10 nM a 1 μM, três antagonistas seletivos de receptor B₂), ou do antagonista seletivo de receptores B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μM). Todos os antagonistas foram adicionados às preparações 10 min antes do agonista. Com o objetivo de escolher o melhor período de equilíbrio do antagonista com o receptor, foi avaliado o efeito de diferentes períodos de incubação (de 5 a 30 min). Longos períodos de incubação (acima de 30 min) não proporcionaram inibição significativa comparada àquela observada aos 10 min (resultados não mostrados). Assim, foi escolhido o tempo de 10 min como o período de incubação nos experimentos subsequentes. Os experimentos controles para BK foram realizados sempre em paralelo na presença de PBS, visando corrigir eventuais alterações na resposta da BK.

3.2.7 - Influência de diferentes classes de drogas sobre a resposta contrátil da BK na vesícula biliar de cobaia

Para avaliar alguns dos mecanismos envolvidos na ação da BK na vesícula biliar de cobaia, após 2 h de equilíbrio, foram obtidas CCR simples ou cumulativas à BK na ausência ou na presença de cada uma das drogas, adicionadas ao banho 10

a 30 min antes da BK: mepiramina (antagonista de receptor histaminérgico H_1 , 1 μ M), atropina (antagonista de receptores muscarínicos, 1 μ M), prazosin (bloqueador do adrenoceptor α_1 , 100 nM), tetrodotoxina (bloqueador de canal rápido de Na^+ dependente da voltagem, 300 nM), glibenclamida (bloqueador de canal de K^+ sensível ao ATP, 1 μ M), CP 96,345 (antagonista de receptor taquicinérgico NKj, 300 nM), ou WEB 2086 (antagonista seletivo do receptor do fator de ativação plaquetária, 100 nM).

3.2.8 - Curvas concentração-resposta cumulativas à DABK na vesícula biliar de cobaia

Para avaliar a influência do tempo de equilíbrio sobre a ação do agonista de receptores B_j , a DABK (0,1 pM a 1 μ M), foram construídas CCRs cumulativas 3, 4, 5, 6 ou 7 horas após a montagem das preparações. Apenas duas CCR completas foram construídas à DABK em cada preparação. Com o objetivo de observar o envolvimento da síntese protéica na alteração tempo-dependente da resposta contrátil à DABK, as preparações foram incubadas com cicloheximida (inibidor de síntese protéica, 70 μ M), incubada ao banho durante todo o tempo que a preparação permaneceu em equilíbrio.

3.2.9 - Influência do cálcio e da PKC na resposta contrátil da vesícula biliar de cobaia à DABK

Para analisar a influência do cálcio extracelular sobre as ações da DABK, foram realizadas CCRs cumulativas em líquido de Krebs normal ou em líquido sem Ca^{2+} contendo EGTA (0,1 mM). Em outra série de experimentos, as preparações foram pré-incubadas com nicardipina (inibidor de canais de Ca^{2+} do tipo L, 100 nM) durante 20 min e novas curvas à DABK foram obtidas na sua presença. Visando analisar a influência da PKC sobre a resposta contrátil à DABK na VBC, as preparações foram incubadas durante 20 min com o inibidor desta enzima, a estaurosporina (100 nM), e novas curvas foram obtidas à DABK na sua presença.

3.2.10 - Efeito dos prostanóides na resposta contrátil da DABK na vesícula biliar de cobaia

Para investigar se a resposta à DABK na vesícula biliar de cobaia envolve a participação de prostanóides, foram construídas CCR completa à DABK, na presença ou na ausência de inibidores da cicloxigenase, indometacina (3 μM) e ibuprofeno (30 μM), ou do inibidor da lipoxigenase, fenidona (30 μM), bem como na presença do inibidor específico da síntese de TXA_2 , dazoxiben (30 nM), do antagonista seletivo do receptor do TXA_2 , L 655,240 (10 nM), ou do antagonista seletivo do receptor de LTD_4 e LTE_4 , o MK 571 (100 nM).

3.2.11 - Efeito dos antagonistas seletivos de receptores B_1 e B_2 sobre a resposta à DABK na vesícula biliar de cobaia

Em outra série de experimentos, foi testada a influência de antagonistas seletivos de receptores B_1 e B_2 sobre a resposta contrátil à DABK na VBC. O HOE 140, NPC 17761 (antagonistas B_2), a des-Arg¹-[Leu⁵]-BK e a des-Arg¹-NPC 17761 (antagonistas B_1) (1 nM) foram incubados nas preparações durante 10 min, e a seguir foram obtidas novas CCRs completas à DABK nas suas respectivas presenças.

3.2.12 - Efeito do tratamento prévio dos animais com endotoxina de *E. coli*

Com o objetivo de analisar a possível síntese *de novo* dos receptores B^1 na resposta contrátil à DABK na VBC, em outro grupo experimental os animais foram tratados com LPS de *E. coli* (30 µg/animal, i.v.), ou somente salina, 24 h antes dos experimentos. As preparações foram isoladas e montadas como descrito anteriormente e foram construídas CCRs completas à DABK.

3.3 - Análise estatística

Os resultados referentes às ações das cininas estão representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), exceto as CE^{50} (i.e., as concentrações dos agonistas que produzem 50 % da resposta máxima), que estão apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança ao nível de 95 % (Fleming *et al.*, 1972). Os valores da CE^{50} foram determinados em experimentos

individuais a partir de curvas concentração-resposta completas ao agonista na ausência ou presença de um antagonista usando o método dos quadrados mínimos. Os valores aparentes do pA^{\wedge} estão apresentados como média \pm E.P.M. e os coeficientes angulares das regressões lineares do cotejamento gráfico de Schild estão apresentados como média acompanhada dos limites de confiança para o nível de 95% (Kenakin, 1993). Os resultados foram analisados estatisticamente aplicando-se o teste t de Student ou através de análise de variância (seguido pelo teste de Dunnett), quando apropriado. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância. As respostas máximas (R_{max}) induzidas pelas cininas também foram comparadas.

Os valores das CE^{\wedge} , para a segunda fase da contração induzida pela BK e demais cininas na vesícula biliar de cobaia, isto é, a concentração necessária do agonista para causar 50 % da resposta relativa àquela causada pelo KCl (80 mM), foram determinados a partir de CCRs individuais do agonista usando o método do quadrado mínimo (Guimarães *et al*, 1992). Para a primeira fase das respostas às cininas as CE_{50} foram calculadas em função do respectivo efeito máximo de cada agonista.

3.4 - Drogas

As drogas usadas foram: bradicinina, Lisil-bradicinina, tirosina⁸-bradicinina, metionil-lisil-bradicinina, Hip[^]-BK, captopril, EGTA (etilenoglicol-bis (-aminoetil

éter)-N, N'-tetra-ácido acético), PBS (solução tampão fosfato, concentração; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e fosfato tamponado 10 mM), BaCl₂, carbacol, apamina, cloreto de nicardipina, cicloheximida, forbol éster (forbol 12-miristato 13-acetato), tetraetilamônio, azul de metileno, L-NMMA (N^ω-monometil-L-arginina), L-NOARG (N^ω-nitro-L-arginina), hexametônio, pirilamina, cimetidina, metisergida, antagonista do receptor do VIP ([D-P-CI-Phe^α, Leu^{*β}]-peptídeo intestinal vasoativo), antagonista do receptor do CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina fragmento 8-37), LPS (sorotipo 0111, L = 2630), H-7 (5 isoquinolinil sulfonil-2 metil piperazina), estaurosporina, indometacina, ibuprofeno, fenidona, tetrodotoxina, hidrocloreto de mepiramina, sulfato de atropina, prostaglandina₂ e prostaglandina_{2α} foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O cloreto de níquel (NiCl₂) Riedel-de-Haen Sellze (Alemanha); HOE 140 (D-Arg^o-[Hip^α, Thi^β D-Tic^α, Oic^β]-BK) e glibenclamida da Hoechst (Frankfurt, Alemanha); des-Arg^o-NPC 17761 (des-Arg^o-D-Arg [Hip^α, D-HipE (trastiofenil)^α, Oic^β]-des-Arg^o-bradicinina), NPC 17761 (D-Arg^o [Hip^α, D-HipE (trastiofenil)^α, Oic^β]-BK) e NPC 17731 (D-Arg^o [Hip^α, D-HipE (transpropil)^α, Oic^β]-BK) da Scios/NOVA (Baltimore, EUA); o FK 888 ((4R)-4hidroxi-1-([1-metil-1H-indol-3-il] carbonil)-L-N-benzil-Nmetil-3-2 (2-naftil)-L-alaninamida) da Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão); SR 48968 ((s)-N-metil-N-[4-acetilamino-4fenilpiperidino-2-(3,4-diclorofenil) butil] benzamida) da Sanofi Reserche Centre

(Monpellier, França); WEB 2086 (3-[4-(2-clorofenil-9-metil-6H-tienò[3, 2-f] [1, 2, 4] triazolo-4, 3 -a) (!, ' 4] -diazepin-2-il) -1- (4 -morfolinil) -1- propanon) da Boehringer-Ingelheim (Alemanha); U46619 (9, 1 l-dideoxi-9 β , 11-etanoepoxi prostaglandina p 2^{\wedge}) da Upjohn Co (Kalamazoo, MI, EUA); rianodina e CP 96,345 ((2,35)-cis-2-(difenilmetil)-N-[(2-metoxifenil)-metil]-1-azabicyclo [2, 2, 2] octan-3-amino) da Research Biochemicals Incorporated RBI (Natick, MA, EUA); MK 571 (3-(3-(2-(7-cloro-2-quinolinil) etenil) fenil) ((3-dimetil amino-3-oxo-propil) tio) metil) ácido propiônico) Merck Frost (Quebec, Canadá); BW 755C (3-amino-1-[3-trifluorometilfenil]-2-pirazolina HCl) da Wellcome Research Laboratories (Beckenham, RU); prazosin (Pfizer, New York, EUA); dazoxiben (Pfizer, Kent, RU); des-Arg⁹⁸ -[Leu]-BK e L-655,240 (3- [1- (4 -clorobenzil) -5 -fluoro -3 -metilindol -2-il] $2, 2$ -ácido dimetilpropanóico) foram gentilmente doadas pelo Dr.P. D'Orleans-Juste e Dr Pierre Sirois (Departamento de Farmacologia, Universidade de Sherbrooke, Canadá).

Muitas drogas foram preparadas em PBS. O SR 48968, FK₈₈₈, prazosin, indometacina, glibenclamida, forbol éster, L-655,240, U46619 e nicardipina foram dissolvidas em etanol absoluto, e a estaurosporina foi dissolvida em dimetilsulfóxido 50%. O EGTA foi adicionado diretamente na solução de Krebs-Henseleit. As soluções estoque (1 a 100 mM) foram mantidas à -18 °C em tubos de plástico siliconizados e diluídas nas concentrações desejadas em PBS, minutos

antes de serem utilizadas. A concentração final de etanol e dimetilsulfóxido no banho não excedeu 0,03 %, não alterando o tônus da preparação ou as respostas dos agonistas. As soluções, bem como os experimentos com nicardipina e MK 571, foram realizados na ausência da luz para evitar a sua fotodegradação. Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e de procedência Merck. A solução de Krebs-Henseleit foi preparada em água destilada e deionizada.

4 - RESULTADOS

4.1 - Fundo de estômago isolado de rato

4.1.1 - Resposta bifásica induzida pela BK e demais cininas no FER

O registro típico representado na figura 1 (A e B) e os resultados da figura 2 (A e B) mostram que todas as cininas estudadas (100 pM a 1 μ M) causaram resposta bifásica concentração dependente no FER pré-contraído com BaCl₂, consistindo de relaxamento seguido de contração. A ordem de potência relativa para a resposta relaxante e para a resposta contrátil foi: Hip³-BK > Met-Lis-BK > BK > Tir³-BK > DABK e Hip³-BK > BK > DABK > Met-Lis-BK > Tir³-BK, respectivamente (Tabela 1). A BK e os peptídeos relacionados foram cerca de 3 a 15 vezes mais potentes em induzir relaxamento do que a contração (Tabela 1). Pode, ainda, ser observado na tabela 1, que as respostas máximas obtidas para a contração induzida pelas cininas no FER não diferiram significativamente entre si, com exceção da resposta contrátil induzida pela DABK (agonista seletivo para receptores B²), que foi significativamente inferior quando comparada aos demais agonistas, correspondendo a aproximadamente 47 % da resposta causada pela BK e peptídeos relacionados. O valor médio da contração no FER induzida pelo BaCl₂ (300 μ M) foi de (média \pm E.P.M.) 2,53 \pm 0,21 g (n = 30).

TABELA 1 - Valores médios das CEJQS e das respostas máximas obtidas para a BK e peptídeos relacionados no fundo de estômago isolado de rato.

AGONISTA	RELAXAMENTO		CONTRAÇÃO	
	CE ₅₀ (nM)	Rmax.(gr)	CE ₅₀ (nM)	Rmax.(g/
Hip [^] -BK	1,25 (0,22-6,87) ^{''}	2,88 ± 0,65	3,90(1,88-5,92) ^{''}	3,36 ±0,63
BK	2,33 (0,39-4,28)	3,01 ±0,58	6,74 (2,32-11,17)	2,22 ± 0,49
DABK	4,99 (3,23-6 ,76)	2,50 ± 0,36	15,95 (11,11-20,79) -	1,23 ±0,06*
Met-Lis-BK	2,02(1,61-2,43)	2,09 ± 0,47	28,38(27,64-29,12)	3,38 ±0,85
Tir [^] -BK	4,55 (4,35-4,74)	2,70 ± 0,50	67,49 (67,04-67,94)	2,63 ± 0,59

[^]Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 a 8 experimentos.

[^] Média geométrica acompanhada por limites de confiança ao nível de 95 %.

* Significativamente diferente da contração causada por outros agonistas.

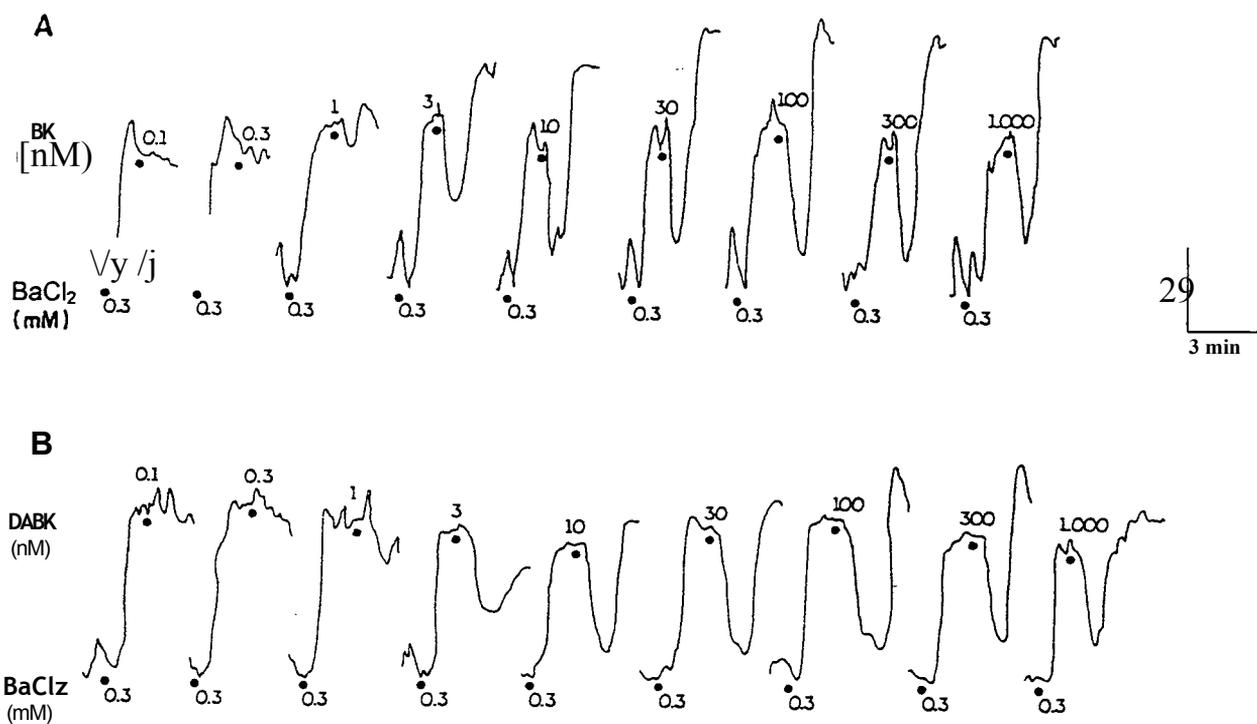


FIGURA 1 - Registro típico representativo mostrando a curva concentração-resposta bifásica completa induzida pela BK (A) e DABK (B) (1 pM a 1 μ M) no fundo de estômago isolado de rato pré-contraído pelo BaCl₂ (300 μ M). Traçados similares foram obtidos em 5 a 7 experimentos adicionais.

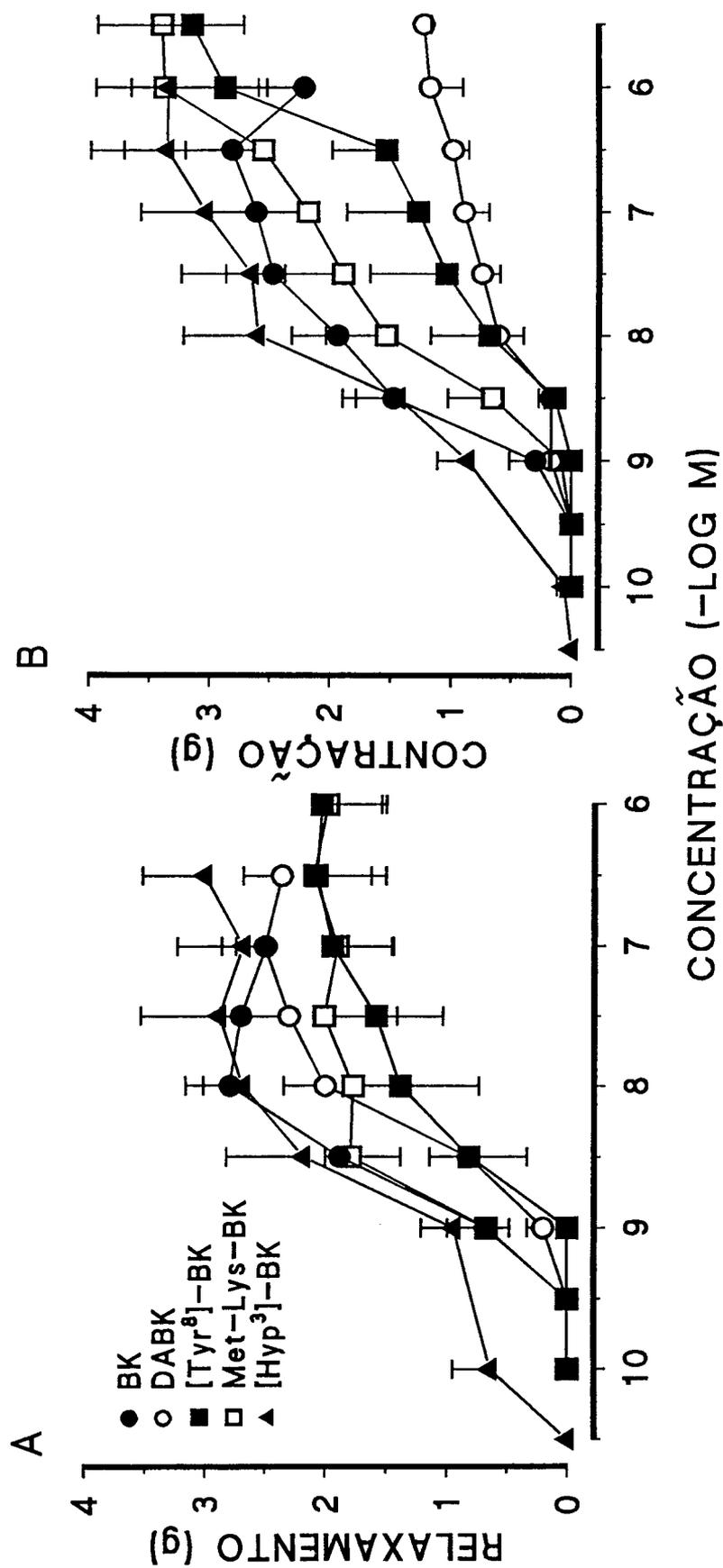


FIGURA 2 - Curvas concentração-resposta médias de relaxamento (A) ou de contração (B) para a BK, DABK, Tyr⁸-BK, Met-Lys-BK e Hyp³-BK no fundo de estômago isolado de rato, pré-contraído pelo BaCl₂ (300 μM). Cada ponto representa a média de 6 a 8 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

4.1.2 - Análise do antagonismo entre o HOE 140 ou des-Arg⁹-NPC 17761 e as cininas

Os resultados da figura 3 B mostram que a incubação prévia das preparações com o HOE 140 (3 a 30 nM) por 10 min causou deslocamento concentração-dependente da CCR no efeito contrátil à BK, sem causar modificação significativa na sua resposta máxima. A aplicação do cotejamento gráfico de Schild a estes resultados forneceu uma reta de regressão cujo coeficiente angular não diferiu significativamente da unidade (média e limites de confiança ao nível de 95 %) de 0,99 (0,88 - 1,40), permitindo, assim, a determinação do valor aparente de pA_2 da ordem de $9,07 \pm 0,27$ (figura 3 C). Entretanto, o HOE 140, independente da concentração utilizada (3 a 30 nM), causou apenas discreto deslocamento de cerca de 4 vezes à direita da CCR de relaxamento à BK (figura 3 A).

A incubação prévia das preparações com o antagonista seletivo de receptores B₂, a des-Arg⁹-NPC 17761 (10 nM a 1 pM) produziu deslocamento concentração dependente para a direita da CCR de relaxamento à DABK, sem alterar significativamente a resposta máxima (figura 4 A). O valor aparente de pA_2 originado após cotejamento gráfico pelo método de Schild (média \pm E.P.M.) foi de $8,35 \pm 0,05$. Entretanto, o coeficiente angular (figura 4 C), foi significativamente diferente da unidade (média e limites de confiança ao nível de 95%) de 0,59 (0,43 -

0,74). Por outro lado, apenas uma alta concentração da des-Arg[^]-NPC 17761 (1 μ M) causou deslocamento significativo à direita (cerca de 4,5 vezes) da CCR contrátil induzida pela DABK no FER (figura 4 B). Além disso, nenhum dos antagonistas apresentou atividade agonística parcial, mesmo na concentração máxima utilizada (1 μ M para a des-Arg[^]-NPC 17761 e 100 nM para o HOE 140) (resultados não mostrados). O HOE 140, mesmo em altas concentrações (100 nM), não foi capaz de antagonizar a resposta bifásica induzida pela DABK no FER. As CE_{50} s médias calculadas (e limites de confiança ao nível de 95 %) foram: **relaxamento**, curva controle 7,83 (4,67 - 10,99) nM e na presença de HOE 140, 9,85 (7,17 - 12,50) nM e para a **contração**, resposta controle 24,20 (21,38 - 27,01) nM e na presença do HOE 140, 15,50 (13,30 - 17,70) nM. O mesmo ocorreu com a des-Arg[^]-NPC 17761 na concentração máxima utilizada de 1 μ M, que também não interferiu significativamente com a resposta bifásica induzida pela BK no FER. As CE_{50} médias foram: **relaxamento**, resposta controle 5,27 (3,50 - 8,78) nM versus 8,10 (4,56 - 10,64) nM na presença de des-Arg[^]-NPC 17761, e para a **contração**, resposta controle 11,26 (2,41 - 20,12) nM e na presença da des-Arg[^]-NPC 17761 17,37(12,36-29,39) nM.

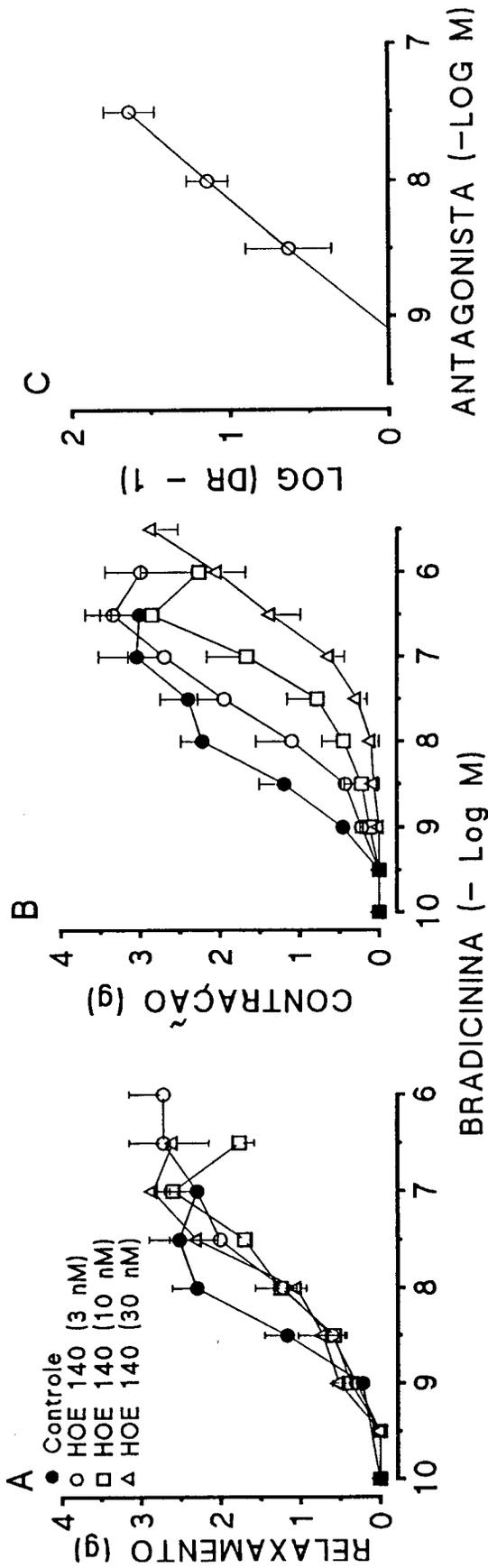


FIGURA 3 - Curvas concentração-resposta médias de relaxamento (A) e de contração (B) para a BK no fundo de estômago isolado de rato, pré-contraído pelo BaCl₂ (300 μM), na ausência ou na presença de diferentes concentrações de HOE 140. O painel C mostra o cotejamento gráfico obtido pelo método de Schild, evidenciando o antagonismo produzido pelo HOE 140 sobre a resposta contrátil induzida pela BK no fundo de estômago de rato. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

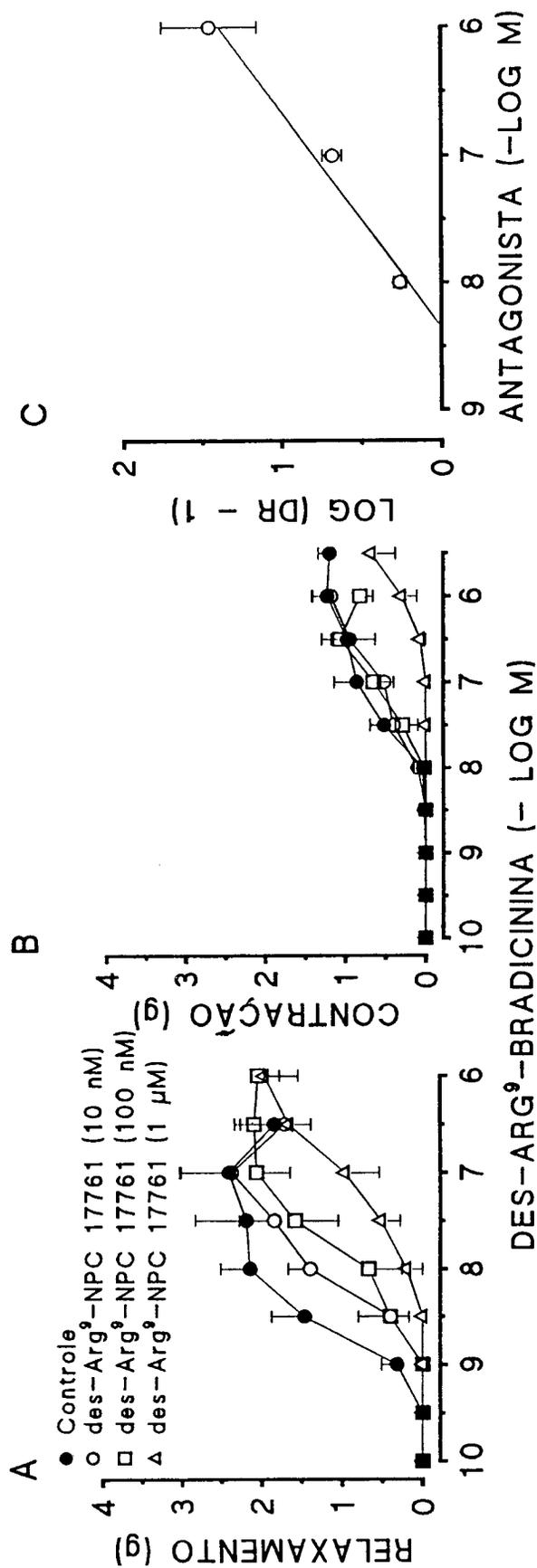


FIGURA 4 - Curvas concentração-resposta médias de relaxamento (A) e de contração (B) para a BK no fundo de estômago isolado de rato, pré-contraído com BaCl₂ (300 μM) na ausência ou na presença de diferentes concentrações de des-Arg⁹-NPC 17761. O painel C mostra o cotejamento gráfico obtido pelo método de Schild para mostrar o antagonismo produzido pela des-Arg⁹-NPC 17761 sobre a resposta relaxante induzida pela DABK no fundo de estômago de rato. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

4.1.3 - Efeito de diversas classes de drogas sobre a resposta bifásica induzida pelas cininas no FER

Os registros típicos apresentados na figura 5 (A, B e C) e os resultados da tabela 2 mostram que os efeitos relaxantes causados pela BK e DABK (100 nM) foram completamente antagonizados tanto pela apamina (1 μ M) como pela nicardipina (1 μ M). Além disso, a apamina, mas não a nicardipina, potencializou significativamente a resposta contrátil induzida pela DABK, mas não pela BK no FER. A incubação das preparações com estaurosporina (10 nM) reduziu de modo significativo a resposta relaxante induzida pela BK, sem afetar a resposta causada pela DABK (Tabela 2). Porém, o forbol éster (1 μ M), NÍCL₂ (300 μ M), azul de metileno (10 μ M), L-NMMA (100 μ M), L-NOARG (100 μ M), metisergida (100 nM), pirilamina (1 μ M), cimetidina (100 nM), hexametônio (100 μ M), WEB 2086 (100 nM), FK 888 (1 μ M), SR 48968 (1 μ M), tetraetilamônio (10 μ M), BW 755c (10 μ M), o antagonista do receptor de CGRP (1 μ M) bem como o antagonista do receptor de VIP (1 μ M) não interferiram significativamente com as respostas bifásicas induzidas pela BK ou pela DABK no FER (resultados não apresentados). Por outro lado, experimentos controles positivos realizados com estas drogas mostraram que elas foram efetivas em antagonizar as respostas mediadas pelos seus respectivos agonistas ou sistemas enzimáticos (resultados não apresentados).

TABELA 2 - Efeito de diversas drogas sobre a resposta bifásica induzida pela BK ou DABK no fundo de estômago isolado de rato.

AGONISTA ANTAG [μ M]			RELAXAMENTO (g)		CONTRAÇÃO (g)	
			Ausência	Presença	Ausência	Presença
BK	Apamina	1	2,72 ± 0,32	0,56 ± 0,24*	2,40 ± 0,40	2,66 ± 0,40
	Nic	1	2,43 ± 0,21	0*	2,12 ± 0,40	2,23 ± 0,22
	Estau	0,01	2,60 ± 0,51	0,71 ± 0,50*	2,70 ± 0,42	2,01 ± 0,50
DABK	Apamina	1	2,56 ± 0,52	0*	0,60 ± 0,22	2,15 ± 0,30*
	Nic	1	2,41 ± 0,30	0*	0,82 ± 0,26	1,40 ± 0,33
	Estau	0,01	2,10 ± 0,11	1,93 ± 0,20	1,22 ± 0,50	1,56 ± 0,52

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 5 a 8 experimentos.

Significativamente diferente do respectivo grupo controle (* P < 0,05).

Abreviações: antagonista (antag), nicardipina (nic) e estaurosporina (estau).

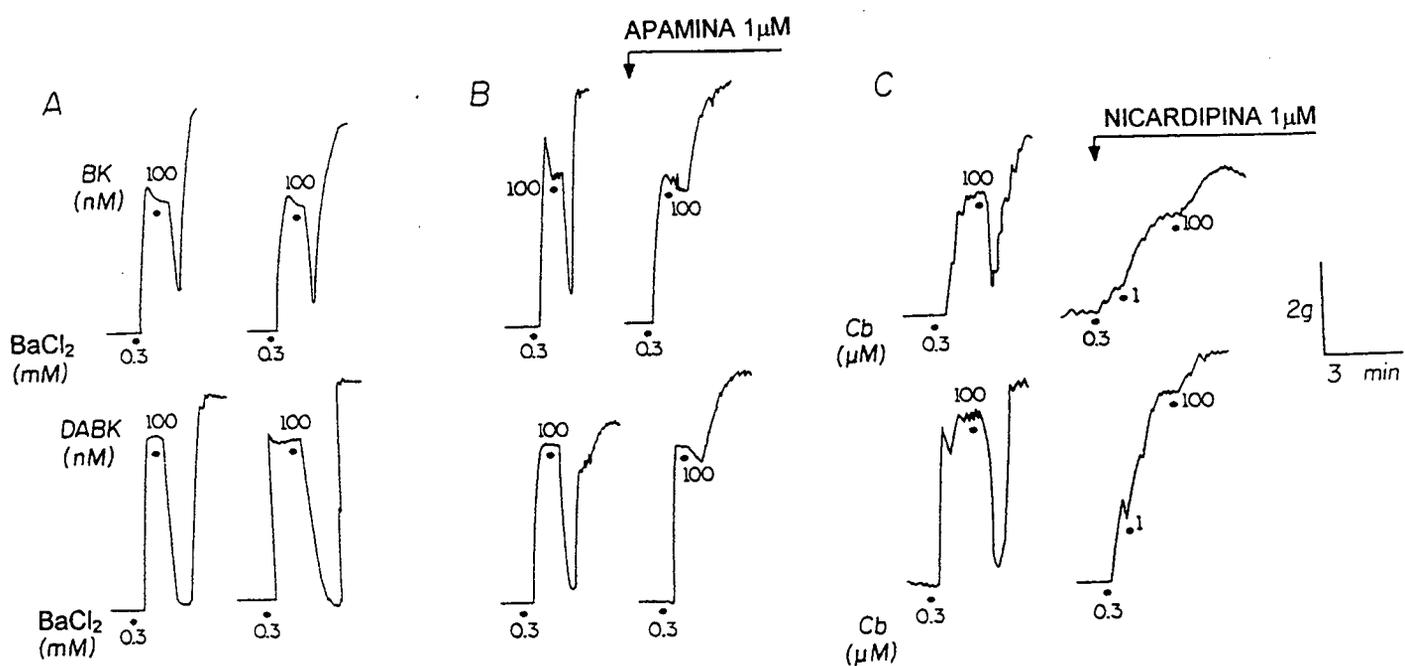


FIGURA 5 - Registros típicos representativos mostrando a resposta bifásica induzida pela BK e a DABK no fundo de estômago isolado de rato pré-contraído com BaCl₂ (300 μM) ou carbachol (300 a 400 nM), na ausência ou na presença de apamina (1 μM) ou nicardipina (1 μM). Registros semelhantes foram obtidos em 6 experimentos adicionais.

4.1.4 - Influência do cálcio na resposta bifásica induzida pelas cininas no FER

Quando o FER foi transferido para solução sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM), o relaxamento causado tanto pela BK quanto pela DABK (100 nM) foi rapidamente reduzido ($TV_{1/2} < 15$ min), desaparecendo completamente ao final de 60 ou 90 min. Entretanto, a resposta contrátil induzida pela BK (100 nM) foi mais resistente à retirada de Ca^{2+} da solução e diminuiu mais lentamente ($VA - 70$ min),

sendo completamente abolida 120 min após a remoção do Ca^{2+} (figura 6). Devido à fraca contração causada pela DABK no FER, sua dependência ao Ca^{2+} extracelular não pode ser analisada.

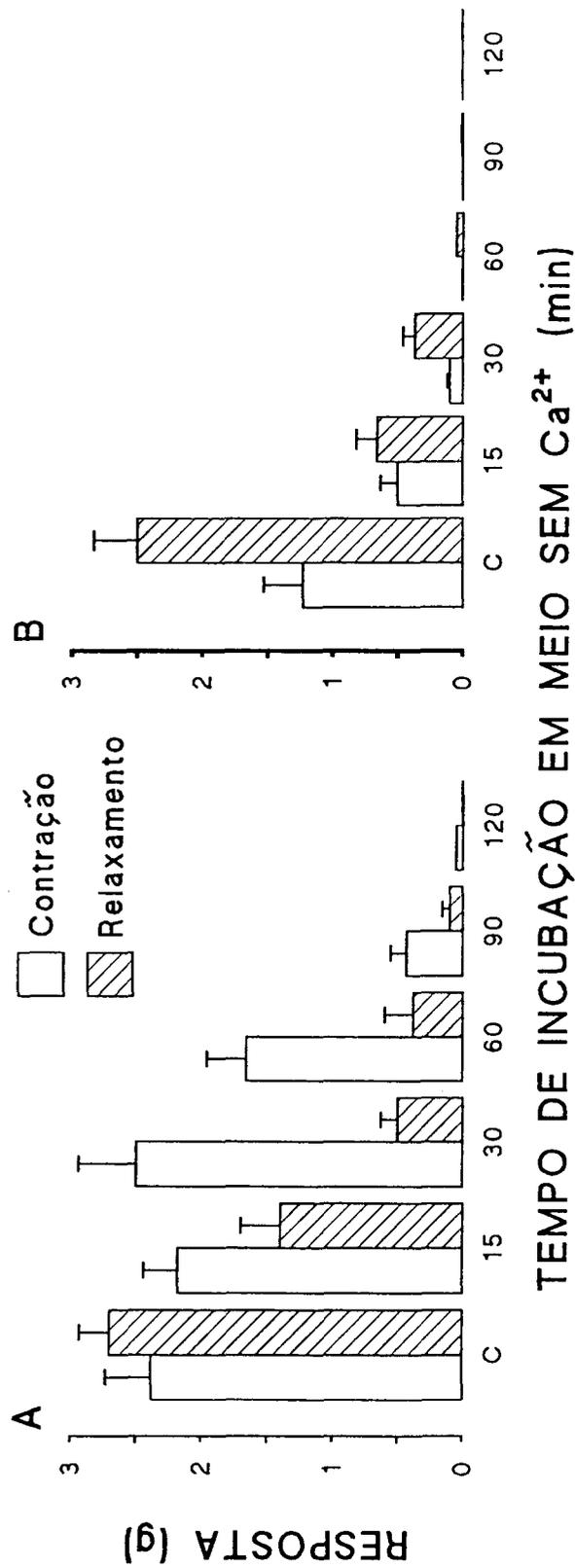


FIGURA 6 - Efeito do cálcio extracelular sobre a resposta bifásica induzida pela BK (A) e a DABK (B) no fundo de estômago isolado de rato pré-contraído com carbacol (10 a 30 nM). Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam o E.P.M.

4.1.5 - Efeito do pré-tratamento com LPS sobre a resposta bifásica induzida pelas cininas no FER

Os resultados mostrados na figura 7 A indicam que o pré-tratamento dos animais com LPS, 24 h antes, resultou em aumento significativo na resposta relaxante máxima induzida pela DABK (de $2,50 \pm 0,36$ g para $3,37 \pm 0,52$ g), mas reduziu significativamente sua CE₅₀ [de 4,99 (3,23 - 6,76) nM para 1,62 (0,14 - 3,40) nM]. Por outro lado, o mesmo tratamento com LPS não modificou significativamente a resposta contrátil induzida pela DABK no FER. As CE₅₀ médias e respostas máximas obtidas para a DABK foram: controle 15,95 (11,11 - 20,79) nM e $1,18 \pm 0,27$ g, contra 26,10 (23,70 - 28,50) nM e $0,78 \pm 0,18$ g nos de animais tratados com LPS, respectivamente (figura 7 B). Porém, o relaxamento induzido pela BK no FER foi significativamente reduzido em preparações obtidas de animais pré-tratados com LPS sem modificar contudo sua CE₅₀: controle $3,01 \pm 0,58$ g e 2,33 (0,39 - 4,28) nM contra $1,99 \pm 0,28$ g e 1,98 (0,21 - 3,75) nM de animais tratados com LPS, respectivamente (figura 7 C). Entretanto, o mesmo tratamento dos animais com LPS não interferiu com a contração induzida pela BK (CE₅₀S e contração máxima foram: controle 6,74 (2,32 - 11,17) nM e $2,62 \pm 0,49$ g contra 5,55 (0,49 - 10,62) nM e $2,30 \pm 0,45$ g, de animais tratados com LPS, respectivamente) (figura 7 D).

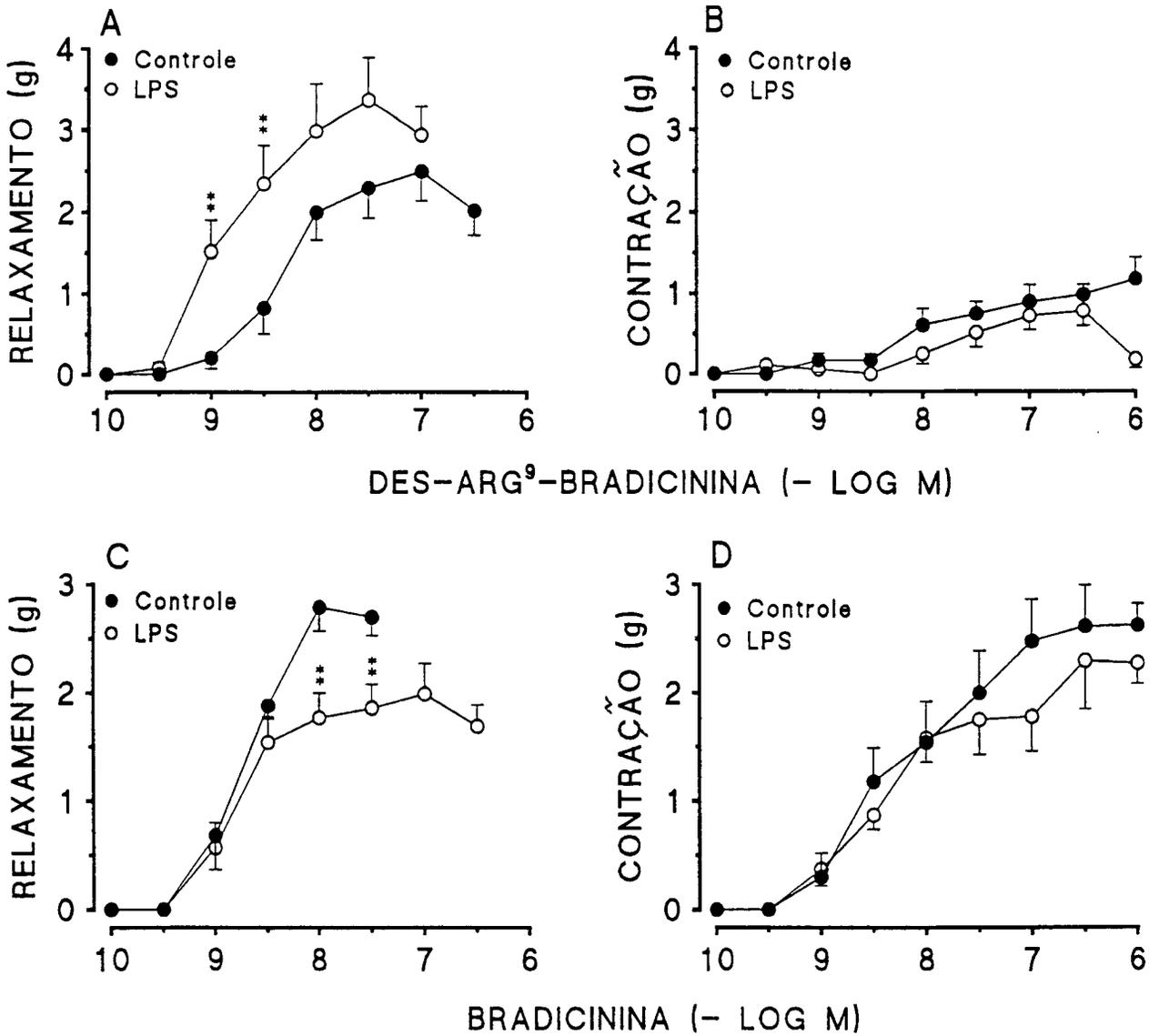


FIGURA 7 - Influência do tratamento prévio dos animais com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$) 24 horas antes, sobre a resposta bifásica induzida pela DABK (A e B) e BK (C e D) no fundo de estômago de rato. Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M.. Difere significativamente do grupo controle * $P < 0,05$. (teste t de Student não pareado).

4.2 - Vesícula biliar isolada de cobaia

4.2.1 - Curvas concentração-resposta à BK e peptídeos relacionados

Os resultados da figura 8 mostram que a BK (0,1 pM - 10 μ M) causou resposta contrátil concentração-dependente na VBC, caracterizada por duas fases distintas: a primeira fase atinge um platô com 1 nM, e segunda fase em concentração acima de 10 μ M. Os resultados da figura 8 (A) também mostram que as CCRs à BK (0,1 pM a 10 μ M), quando realizadas 2, 3, 4 e 5 h após o equilíbrio. Como pode ser observado, houve aumento significativo na primeira fase da contração induzida pela BK na VBC quando as preparações permaneceram em equilíbrio por cerca de 4 h. A figura 8 (B) mostra que todas as cininas estudadas, quando adicionadas à VBC (0,1 pM a 10 μ M) após 2 h de equilíbrio causam respostas contráteis concentração-dependentes. A ordem de potência observada para a primeira fase foi: BK = Hyp⁺-BK = Lys-BK > Tyr⁺-BK > Met-Lys-BK, enquanto que para a segunda fase foi: Hyp⁺-BK > Met-Lys-BK > Tyr^{*}-BK > Lys-BK > BK. As contrações (em g de tensão) causadas por 10 μ M destes peptídeos (concentração máxima utilizada) na VBC foram também semelhantes (Tabela 3). A contração induzida pela BK na VBC parece envolver a ativação do receptor B₂, considerando que a DABK, agonista seletivo dos receptores B⁺, em concentração superior a 1 μ M, causou apenas pequena resposta contrátil nesta preparação (0,21 \pm 0,05 g), correspondendo aproximadamente a 10% daquela causada pela BK (figura 8 B).

TABELA 3 - Valores médios das CE₅₀S (primeira fase e segunda fase) e das respostas máximas (Rmax) obtidas para a BK e outras cininas na vesícula biliar isolada de cobaia.

AGONISTAS	PRIMEIRA FASE" (pM)	SEGUNDA FASE" (nM)	Rmax ^b (g)	n
KCl (80 mM)	-	-	1,50 ±0,17	20
BK	1,35 (0,63-2,89)	77,35 (26,23-228,07)	1,65 ±0,12	10
Hyp [^] -BK	1,44 (0,41-5,08)	8,95 (4,04- 19,86)	1,76 ±0,09	5
Lys-BK	1,54 (0,25-9,26)	60,92 (21,69-171,07)	1,45 ±0,13	9
Tyr [^] -BK	2,72 (0,45-16,33)	33,75 (5,85-194,82)	1,36 ±0,15	8
Met-Lys-BK	4,30(0,52-35,25)	12,78(2,51-64,89)	1,36 ±0,15	5

[^] Limites de confiança ao nível de 95%, respostas calculadas em relação à contração causada pelo KCl (80 mM) ou em relação à contração induzida pela concentração de 10 µM dos agonistas (a maior concentração utilizada).

^b Média ±E.P.M.

Os resultados foram analisados pelo método da análise de variância seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett.

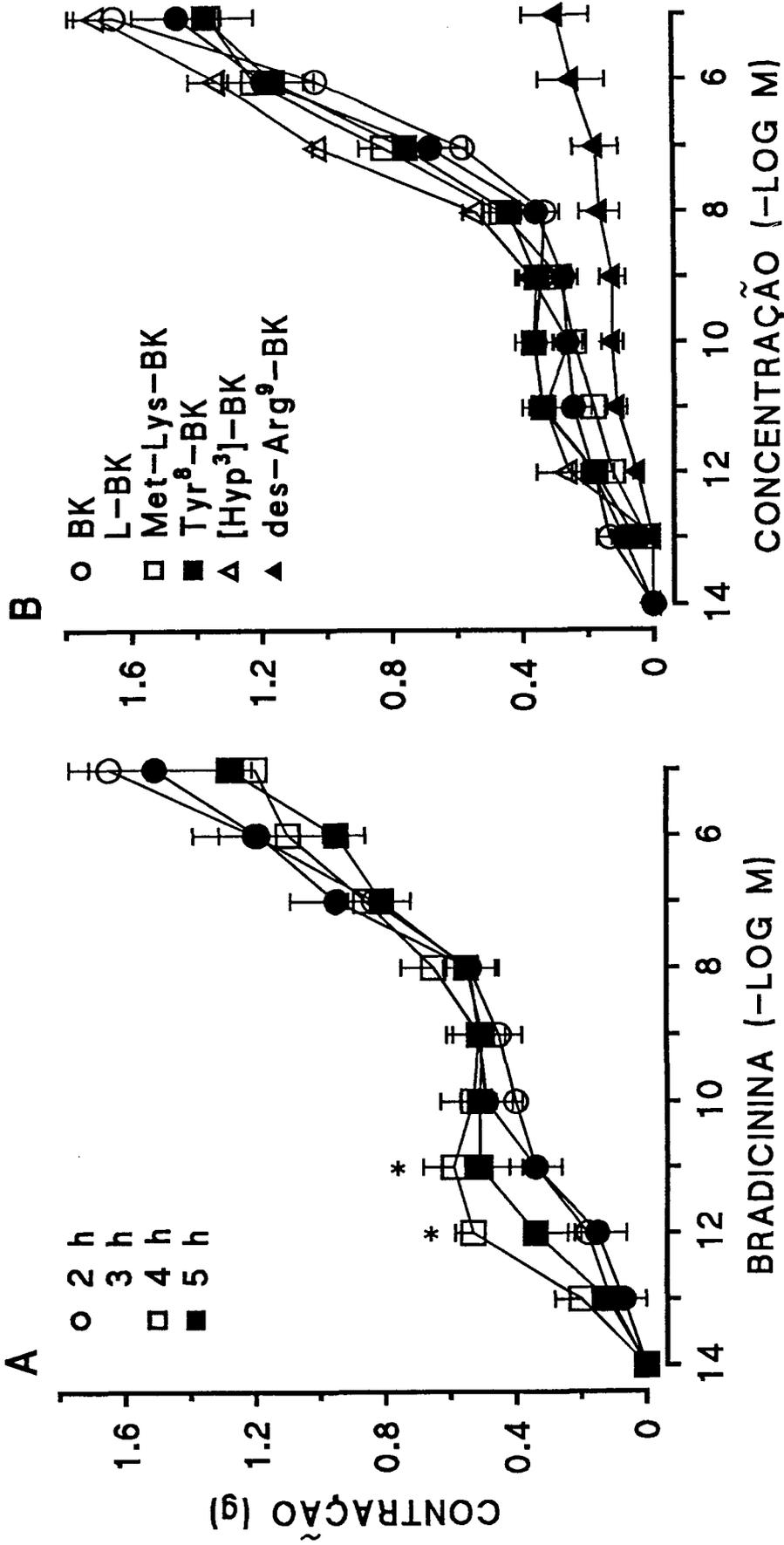


FIGURA 8 - (A) Curvas concentração-resposta médias à BK na vesícula biliar de cobaia 2, 3, 4 ou 5 horas após a montagem da preparação. (B) Curvas concentração-resposta médias à BK, Lys-BK, Met-Lys-BK, Tyr⁸-BK, Hyp³-BK e DABK na vesícula biliar de cobaia 2 horas após a montagem das preparações. Cada ponto representa a média de 6 a 9 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M.. Difere significativamente do grupo controle (2 h) * $P < 0,05$. (teste t de Student não pareado).

4.2.2 - Influência do cálcio extra- e intracelular na contração induzida pela BK na

YBQ

A incubação prévia das preparações com nicardipina (100 nM) durante 20 min, reduziu parcial, porém significativamente, a primeira, mas não a segunda fase da resposta contrátil induzida pela BK ($P < 0,05$, teste t não pareado) (figura 9 A). No entanto, a resposta contrátil causada pela BK na VBC não foi significativamente afetada quando os experimentos foram realizados em líquido sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM) (figura 9 B). Entretanto, a incubação prévia das preparações mantidas em meio sem Ca^{2+} , com rianodina (10 μ M), inibiu significativamente ambas as fases da contração induzida pela BK (figura 9 C).

4.2.3 - Influência dos inibidores e ativadores da proteína quinase C na resposta à BK na VBC

A incubação prévia das preparações com inibidores da PKC, estaurosporina (100 nM) ou H-7 (3 μ M) ou com o ativador seletivo desta enzima, o forbol éster (1 μ M), não modificou significativamente o tônus das preparações e também não afetou a contração induzida pela BK (figura 10 A, B e C).

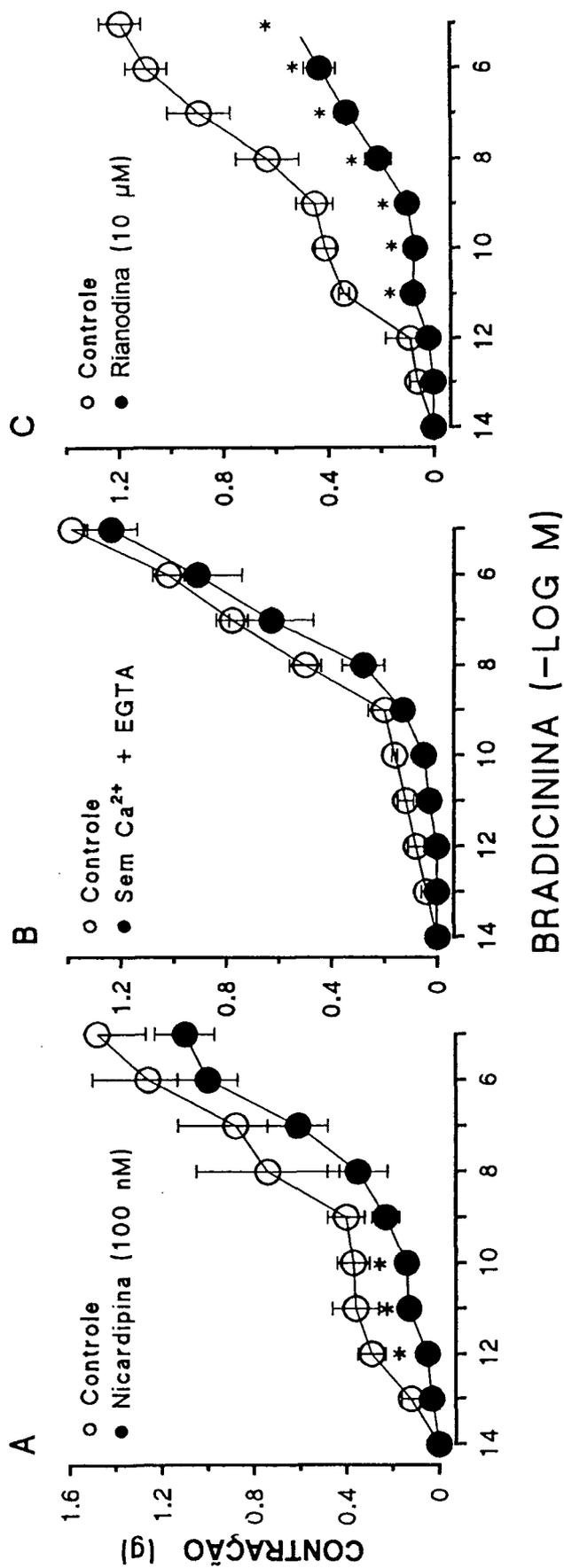


FIGURA 9 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar de cobaia na ausência ou na presença de nicardipina (A), em solução sem cálcio mais EGTA (B) ou na presença de solução sem cálcio mais rianodina (C). Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M.. Difere significativamente do grupo controle * $P < 0,05$. (teste t de Student não pareado).

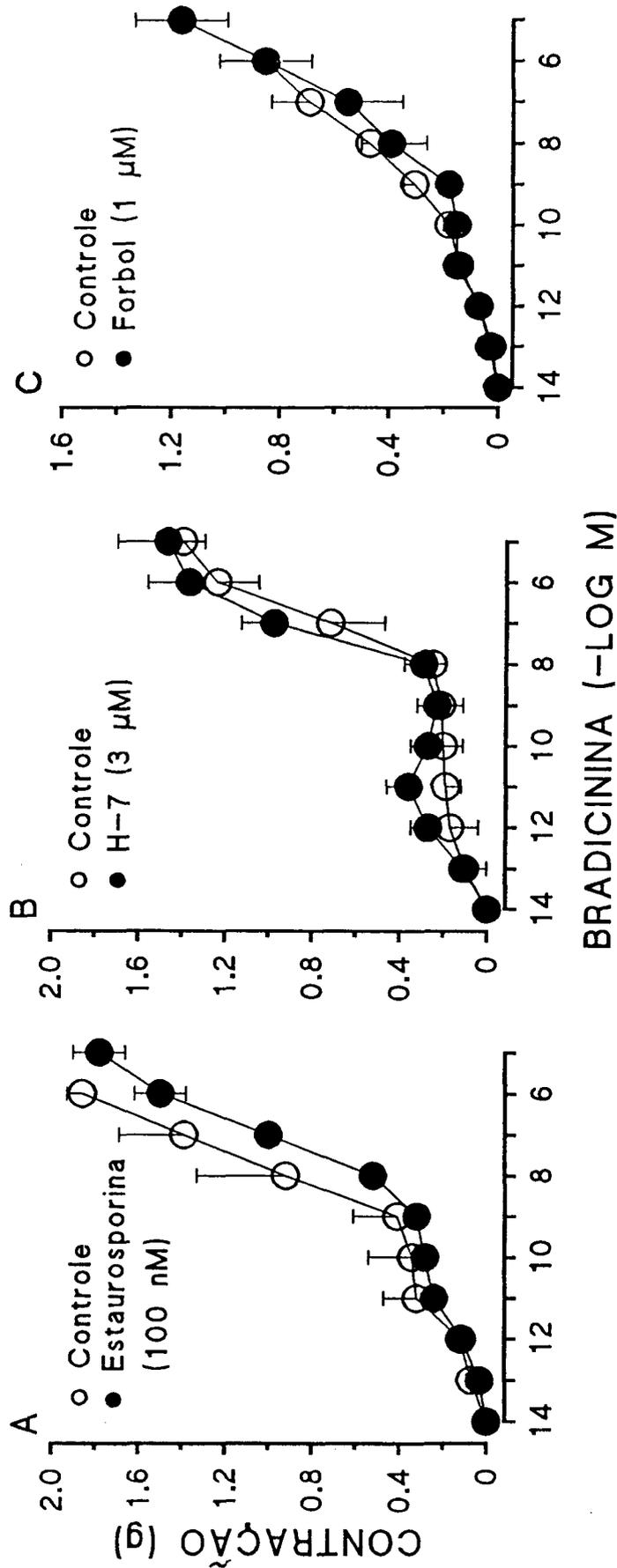


FIGURA 10 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar isolada de cobaia na ausência ou na presença de estaurosporina (A), H-7 (B), ou forbol éster (C). Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

4.2.4 - Influência dos prostanóides na VBC

Os dados da figura 11 (A e B) mostram que ambas as fases da contração induzida pela BK na VBC foram antagonizadas significativamente pela indometacina ($3 \mu\text{M}$) ou pelo ibuprofeno ($30 \mu\text{M}$). Entretanto, a contração induzida pela BK na VBC foi apenas parcialmente inibida pela fenidona ($30 \mu\text{M}$) (figura 12 A), mas não foi afetada pelo dazoxiben (30 nM), L-655,240 (10 nM) (figura 11 C e D), WEB 2086 (100 nM) ou pelo MK571 (100 nM) (figura 12 B e C).

Os resultados da figura 13 (A, B e C) mostram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 e o U46619 (100 pM a $100 \mu\text{M}$), causam contração concentração-dependente na VBC. Os valores médios das CE_{50} s (limites de confiança ao nível de 95%) foram: $\text{PGF}_{2\alpha}$ $1,7 (0,4 - 7,4) \mu\text{M}$; PGE_2 $3,1 (0,9 - 10,7) \mu\text{M}$ e U46619 $0,48 (0,1 - 1,5) \text{ nM}$. As respostas máximas obtidas, em g de tensão, foram: $1,32 \pm 0,20$ para $\text{PGF}_{2\alpha}$; $1,36 \pm 0,15$ para PGE_2 e $0,96 \pm 0,09$ para o U46619.

4.2.5 - Efeito de antagonistas de receptores B_1 e B_2 na contração induzida pela BK na VBC

Os antagonistas seletivos para os receptores B_2 , HOE 140, NPC 17761 e NPC 17731 (10 nM a $1 \mu\text{M}$), adicionados às preparações 10 min antes, não afetaram o tônus basal das preparações, mas causaram deslocamento concentra-

dependente à direita da CCR induzida pela BK na VBC (figura 14 A, B e C). Como não foram testadas concentrações de BK acima de 3 μ M, não foi possível atingir a resposta máxima à BK na presença dos antagonistas e conseqüentemente não permitindo a estimativa dos valores de pA₂.- A incubação prévia das preparações com o antagonista seletivo de receptores B¹, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μ M), não afetou a CCR à BK (figura 15).

4.2.6 - Efeito de diversas classes de drogas sobre a resposta contrátil induzida pela BK na VBC

A incubação prévia das preparações com tetrodotoxina (300 nM), glibenclamida (1 μ M), mepiramina (1 μ M), atropina (1 μ M), prazosin (100 nM) ou com CP 96,345 (300 nM) (Tabela 4) não afetou significativamente a resposta contrátil induzida pela BK. Os experimentos positivos realizados para estas drogas mostraram que elas foram efetivas em antagonizar as respostas mediadas pelos seus respectivos agonistas ou sistemas enzimáticos (resultados não apresentados).

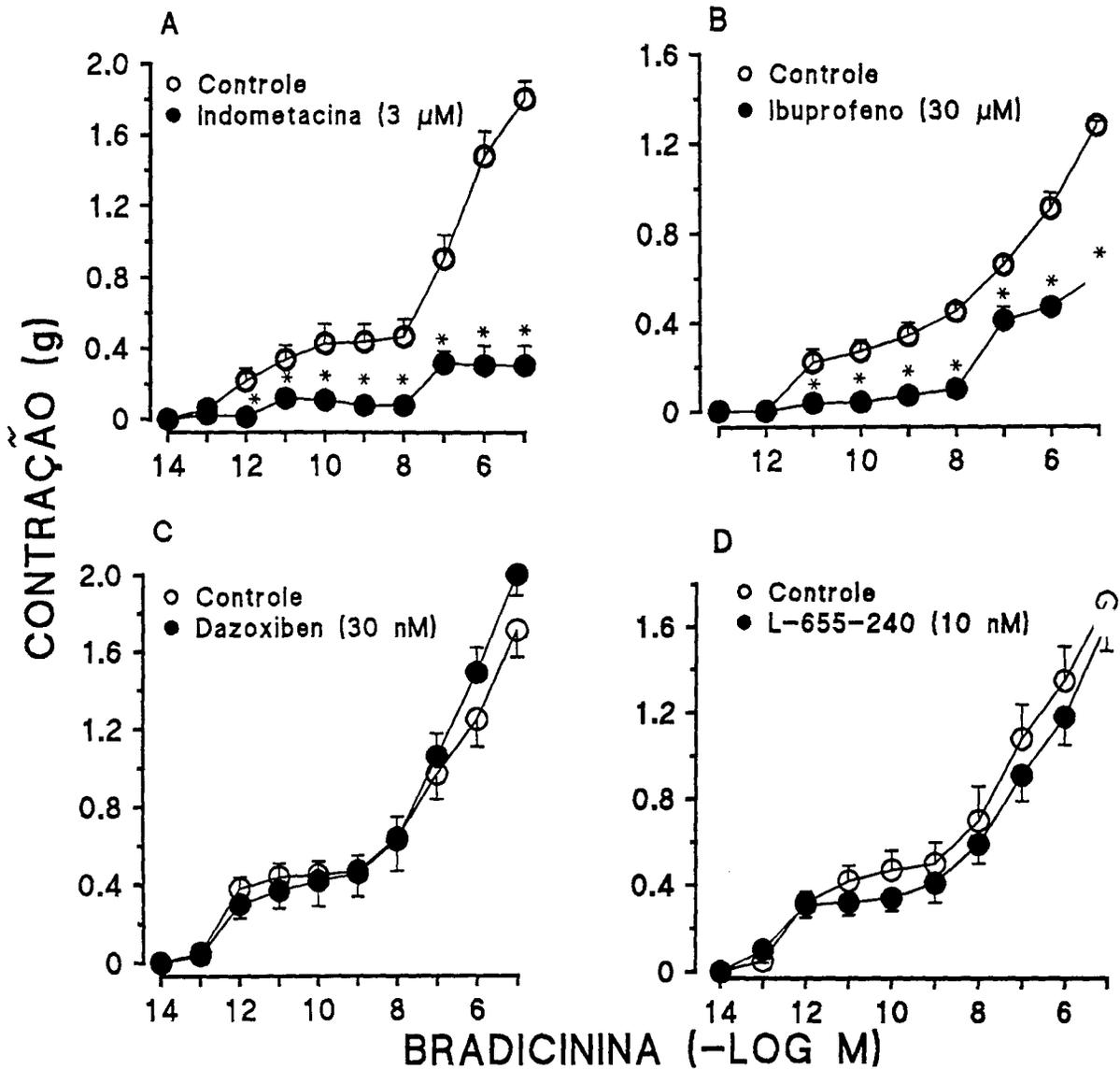


FIGURA 11 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar de cobaia na ausência ou na presença de indometacina (A), ibuprofeno (B), dazoxiben (C) ou L 6555, 240 (D). Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M.. Difere significativamente do grupo controle * $P < 0,05$ (teste t de Student não pareado). Em alguns pontos, os erros padrão estão inseridos nos símbolos.

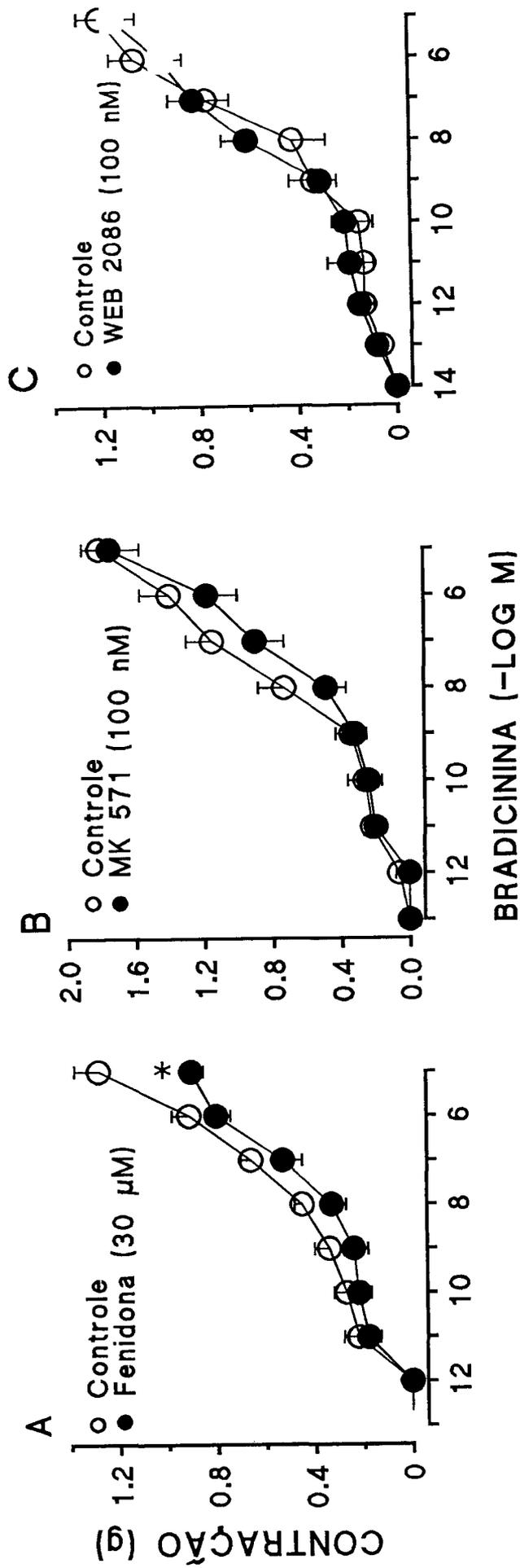


FIGURA 12 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar de cobaia na ausência ou na presença de fenidona (A), MK 571 (B) ou WEB 2086 (C). Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M.. Difere significativamente do grupo controle * $P < 0,05$. (teste t de Student não pareado).

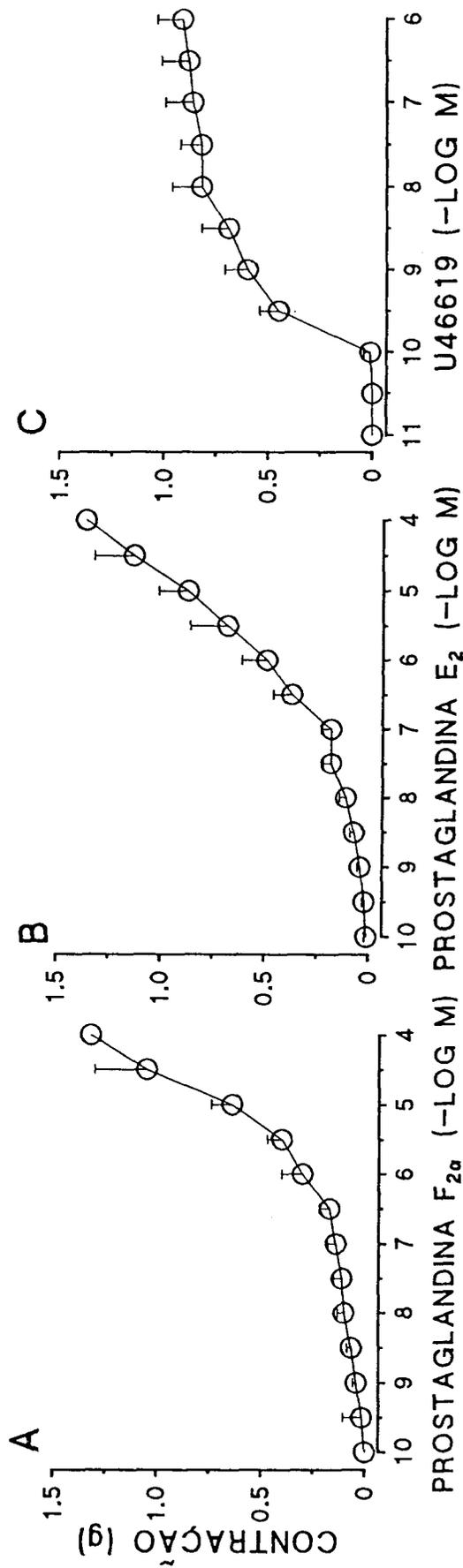


FIGURA 13 - Curvas concentração-resposta médias para a prostaglandina $F_{2\alpha}$ (A), prostaglandina E_2 (B) ou U46619 (C) na vesícula biliar isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

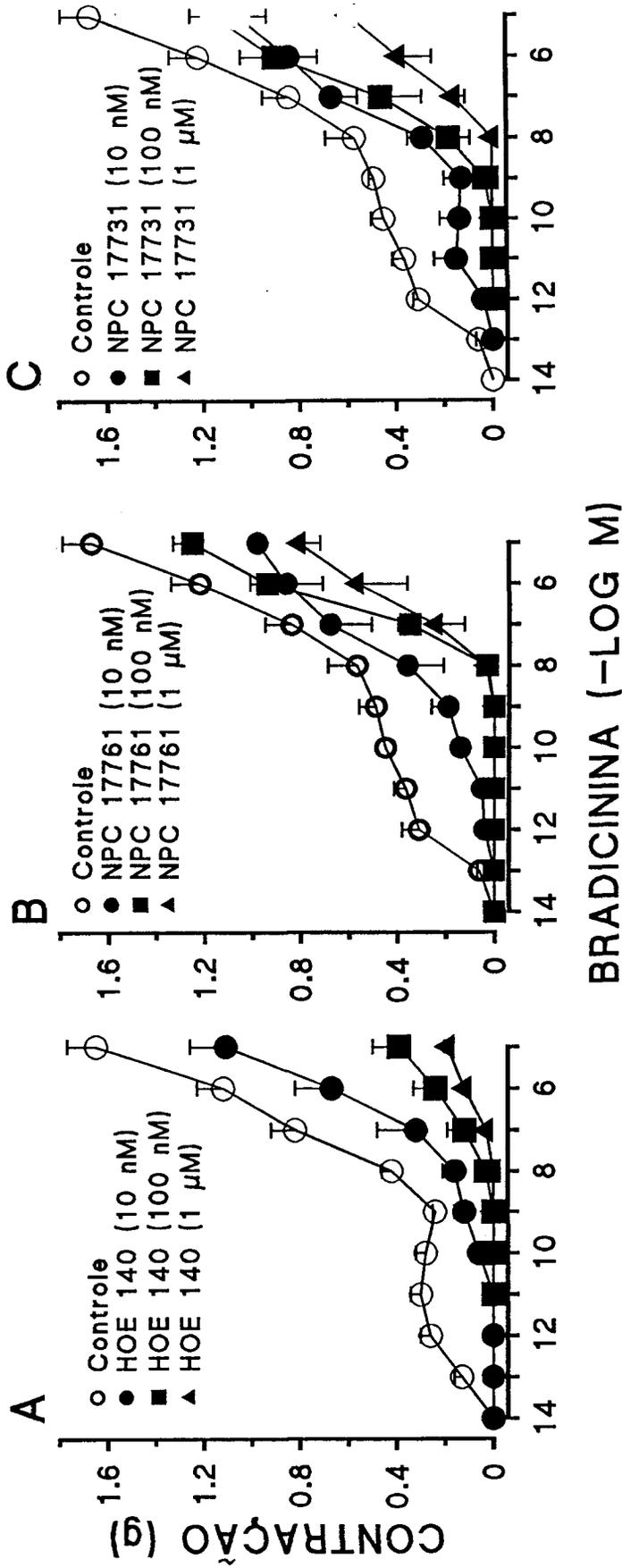


FIGURA 14 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar isolada de cobaia na ausência ou na presença de concentrações crescentes de HOE 140 (A), NPC 17761 (B) ou NPC 17731 (C). Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

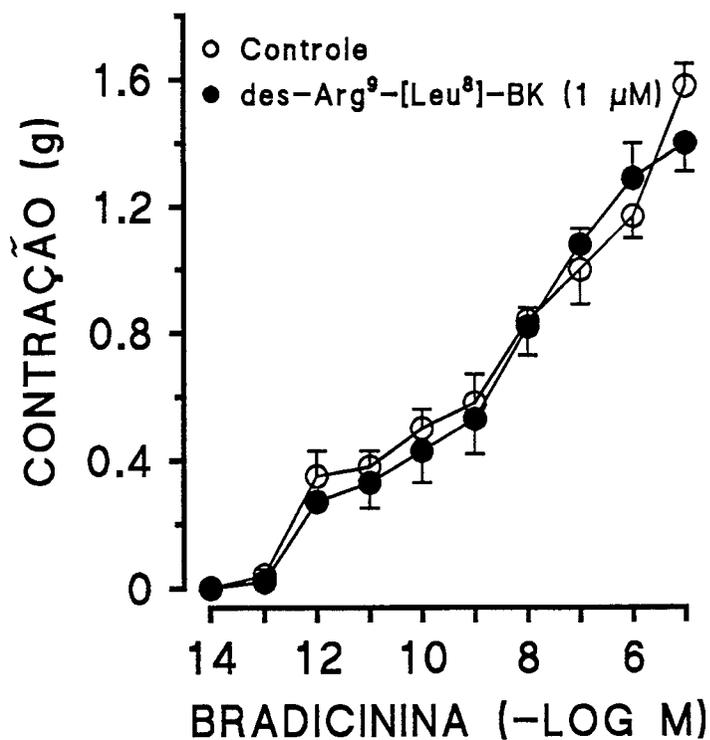


FIGURA 15 - Curvas concentração-resposta médias para a BK na vesícula biliar isolada de cobaia na ausência ou na presença de des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK. Cada ponto representa a média de 5 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os E.P.M..

TABELA 4 - Efeito de diversas classes de drogas sobre a resposta contrátil induzida pela BK (100 nM) na vesícula biliar isolada de cobaia.

AGENTES	CONCENTRAÇÃO <i>ivM</i>)	CONTRAÇÃO (g)	
		AUSÊNCIA	PRESENÇA
Tetrodotoxina	0,3	0,69 ±0,09	0,80 ± _{0,01}
Glibenclamida	_{1,0}	0,55 ±0,15	0,55 ±0,12
Mepiramina	_{1,0}	0,69 ±0,10	0,71 ±0,11
Atropina	_{1,0}	0,65 ± 0,08	0,51 ±0,03
CP 96,345	0,3	_{1,01} ±0,06	1,03 ±0,07
Prazosin	_{0,1}	1,08 ±0,08	1,08 ± _{0,11}

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado.

4.2.7 - Efeito contrátil da DABK na VBC

Os resultados da figura 16 (A) mostram que a adição de DABK na VBC causa contração concentração-dependente, sendo esse efeito modificado em função do tempo de equilíbrio do tecido (3 a 7 h). As respostas contráteis à DABK foram significativamente maiores 6 h após a montagem das preparações. Após 3 h de equilíbrio, a CE_{50} foi de 2,4 (0,8 - 6,0) pM e a resposta máxima de $0,3 \pm 0,02$ g, enquanto que, após 6 h a CE_{50} foi de 16,4 (1,6 - 160,0) pM e a resposta máxima foi de $0,6 \pm 0,08$ g ($P < 0,05$). Esse aumento da resposta à DABK, após 6 h de equilíbrio, foi bloqueado pelo inibidor da síntese protéica, cicloheximida (70 μ M), incubado nas preparações durante as 6 h (figura 16 B).

4.2.8 - Influência do cálcio extracelular e da proteína quinase C sobre a resposta contrátil à DABK na VBC

A adição de nicardipina diminuiu significativamente a resposta contrátil à DABK na VBC (figura 17 A). A remoção do Ca^{++} da solução nutritiva em líquido contendo EGTA (100 μ M) aboliu a resposta contrátil à DABK (figura 17 B). Os resultados da figura 17 C indicam que a estaurosporina (100 nM) não afetou a contração à DABK da VBC.

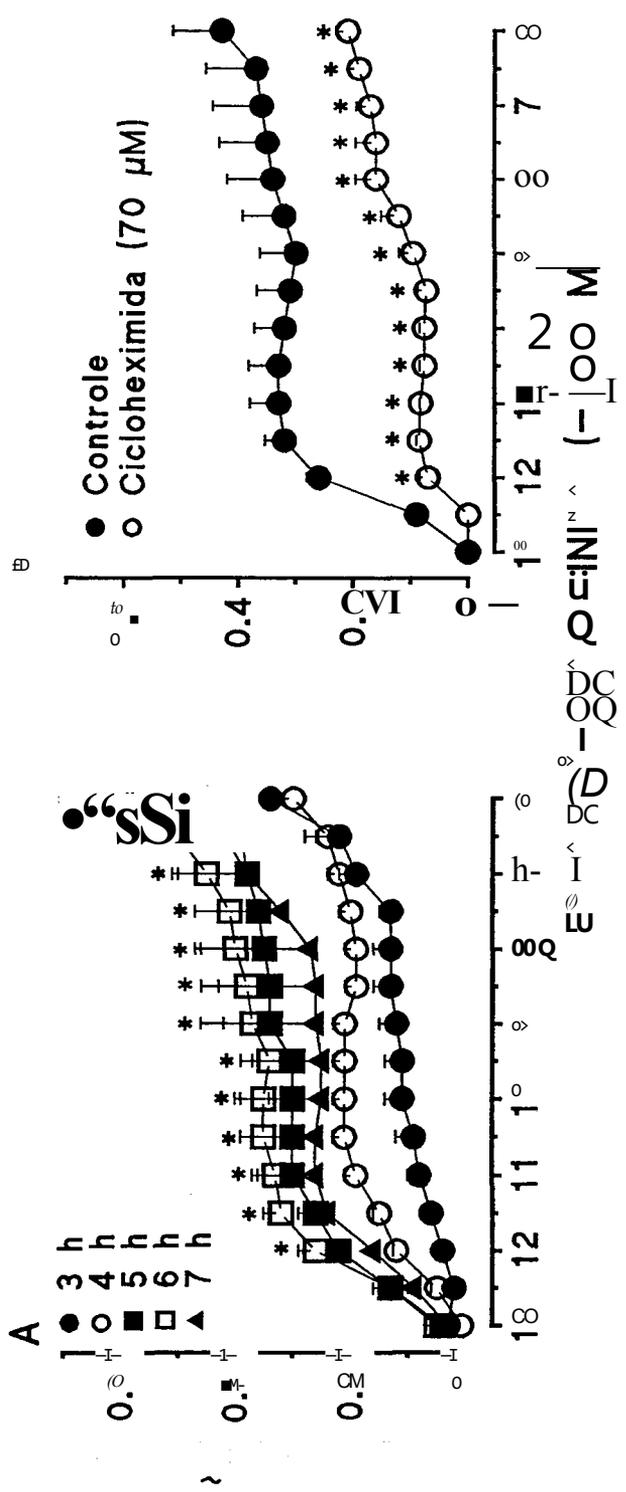


FIGURA 16 - (A) ^{35}S excretion in control and Cycloheximida treated rats. The graph shows that Cycloheximida treatment significantly reduces the excretion of ^{35}S in bile over time. **(B)** ^{14}C excretion in control and Cycloheximida treated rats. The graph shows that Cycloheximida treatment significantly reduces the excretion of ^{14}C in bile over time. Asterisks (*) indicate statistical significance.

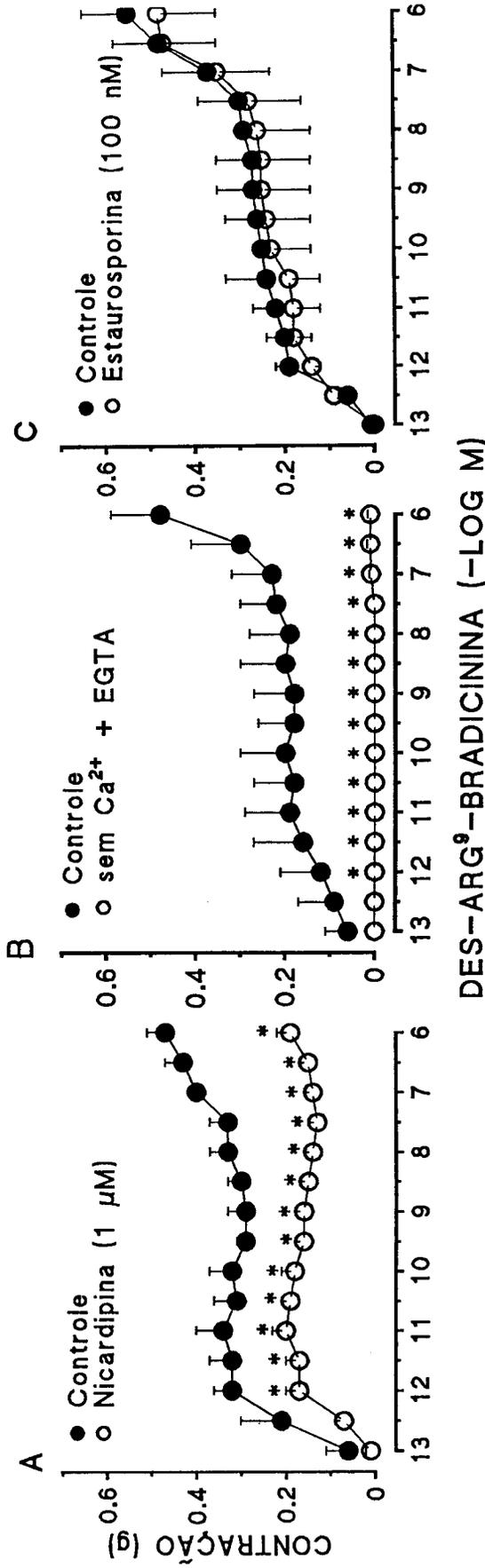


FIGURA 17 - Curvas concentração-resposta médias à des-Arg⁹-bradycinin da vesícula biliar isolada de cobaia obtidas na ausência ou na presença de nicardipina (A), em meio sem cálcio contendo EGTA (B) ou na presença de estaurosporina (C). Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as linhas verticais indicam os erros padrão das médias. Em alguns pontos, os erros padrão estão inseridos nos símbolos. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

4.2.9 - Influência dos prostanóides sobre a resposta contrátil à DABK na VBC

A resposta contrátil da DABK na VBC foi quase que completamente antagonizada pela presença de indometacina (3 μ M) ou de ibuprofeno (3 μ M) (figura 18 A e C). O dazoxiben (30 nM) não afetou a resposta contrátil à DABK (figura 18 B). Resultados semelhantes foram obtidos na presença de L 655, 240 (1 μ M) (figura 18 D). Entretanto, a incubação das preparações com fenidona (30 μ M) inibiu marcadamente a resposta contrátil à DABK na VBC, enquanto que o MK 571 (100 nM) causou apenas inibição parcial da CCR à DABK (figura 19 A e B).

4.2.10 - Influência dos antagonistas seletivos de receptores B_1 e B_2 sobre a resposta à DABK

A incubação prévia das preparações com antagonistas seletivos de receptores B_1 , des-Arg¹-[Leu⁵]-BK ou des-Arg¹-NPC 17761 (1 μ M) não afetou a CCR à DABK na VBC (figura 20). Ao contrário, a incubação das preparações com o HOE 140 ou o NPC 17731 (1 μ M, antagonistas seletivos de receptores B_2), causou inibição significativa da CCR à DABK, com característica de antagonismo não competitivo (figura 21 A e B).

4.2.11 - Influência do tratamento dos animais com LPS sobre a resposta contrátil à DABK na VBC

O tratamento prévio dos animais com LPS (30 µg/animal, i.v.), 24 h antes da montagem das preparações, não causou qualquer alteração da resposta contrátil à DABK, avaliada 6 h após a montagem (figura 22).

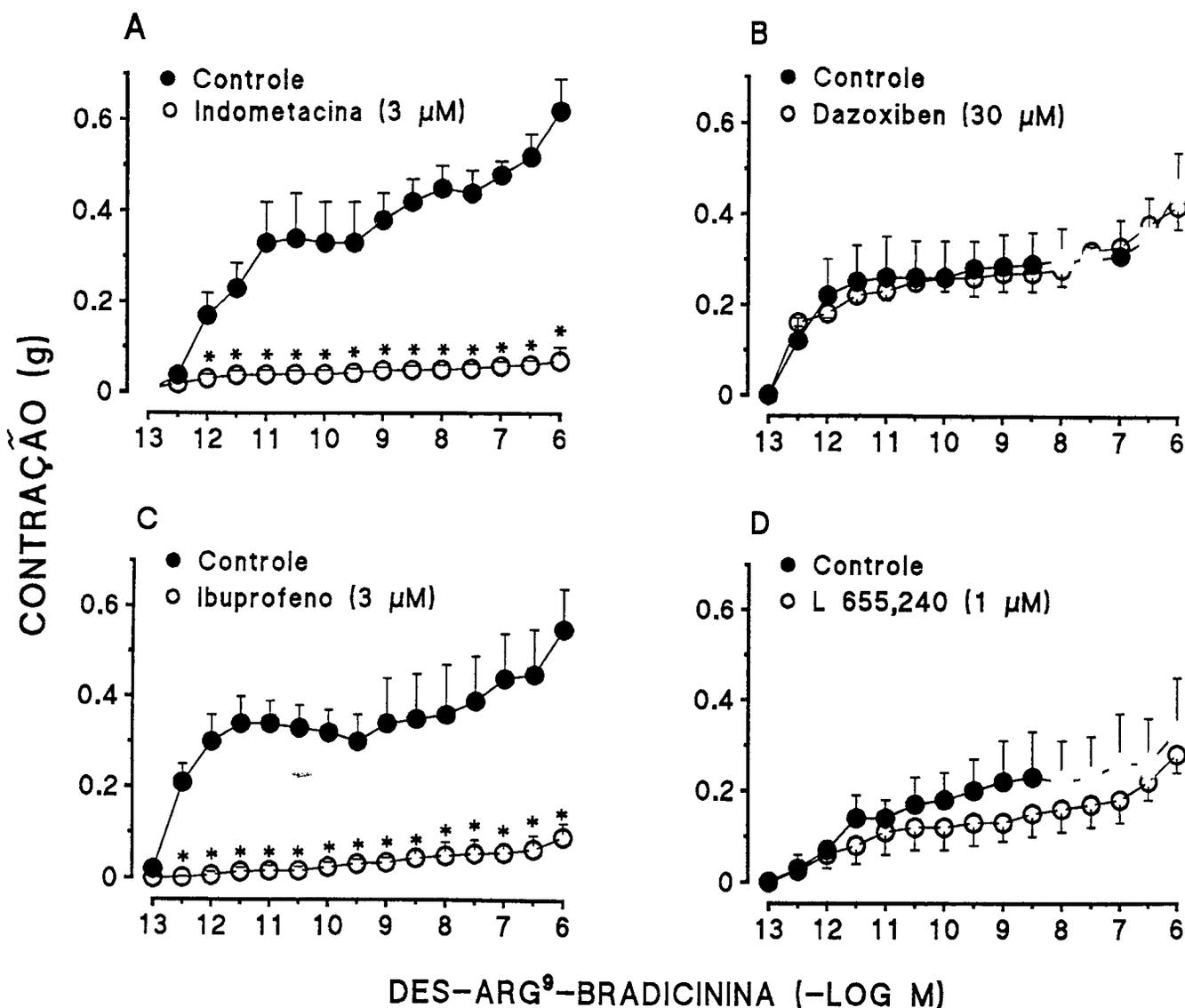


FIGURA 18 - Efeito da indometacina (A), dazoxiben (B), ibuprofeno (C) ou L 655,240 (D) sobre a resposta contrátil à des-Arg⁹-bradicinina da vesícula biliar isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Em alguns pontos, os erros padrão estão inseridos nos símbolos. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

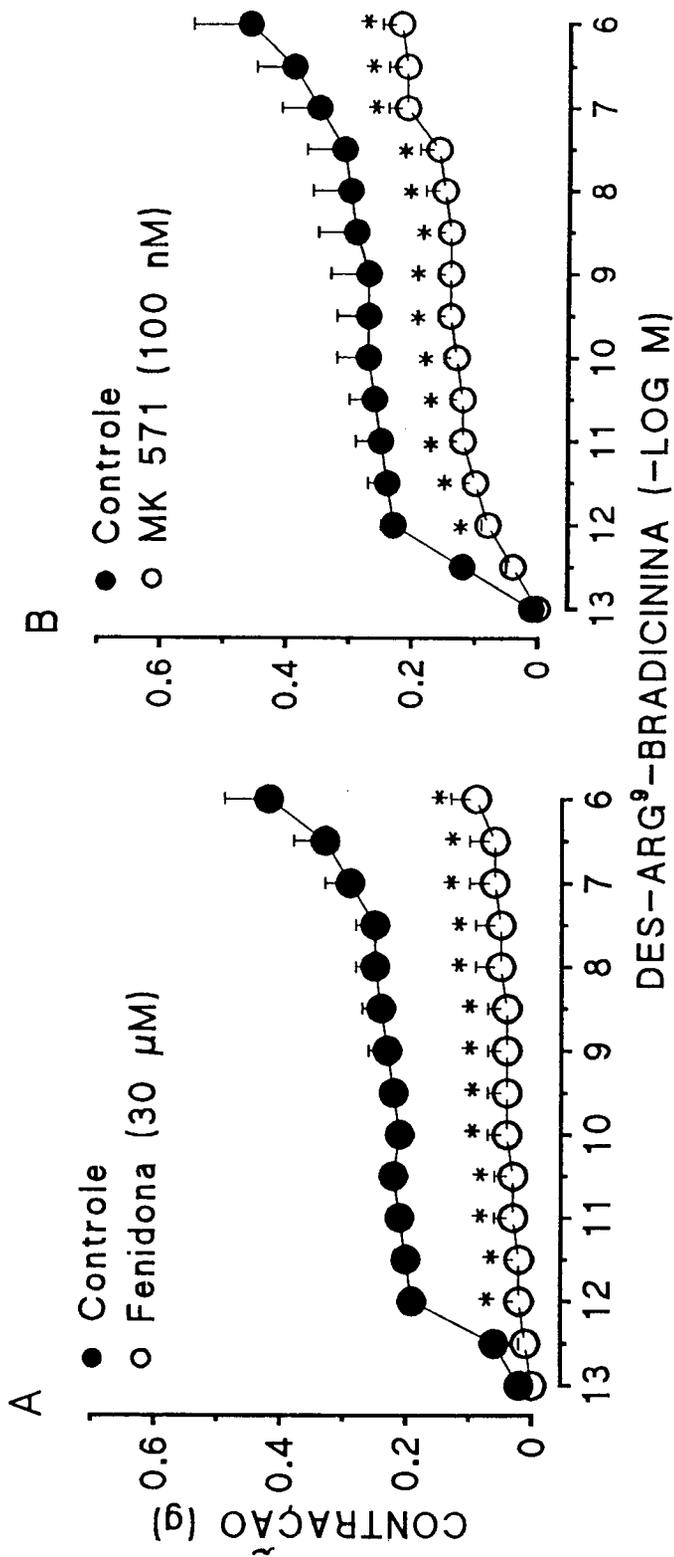


FIGURA 19 - Influência da fenidona (A) ou do MK 571 (B) sobre a resposta contrátil à des-Arg⁹-bradicinina da vesícula biliar isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 6 a 7 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Em alguns pontos, os erros padrão estão inseridos nos símbolos. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

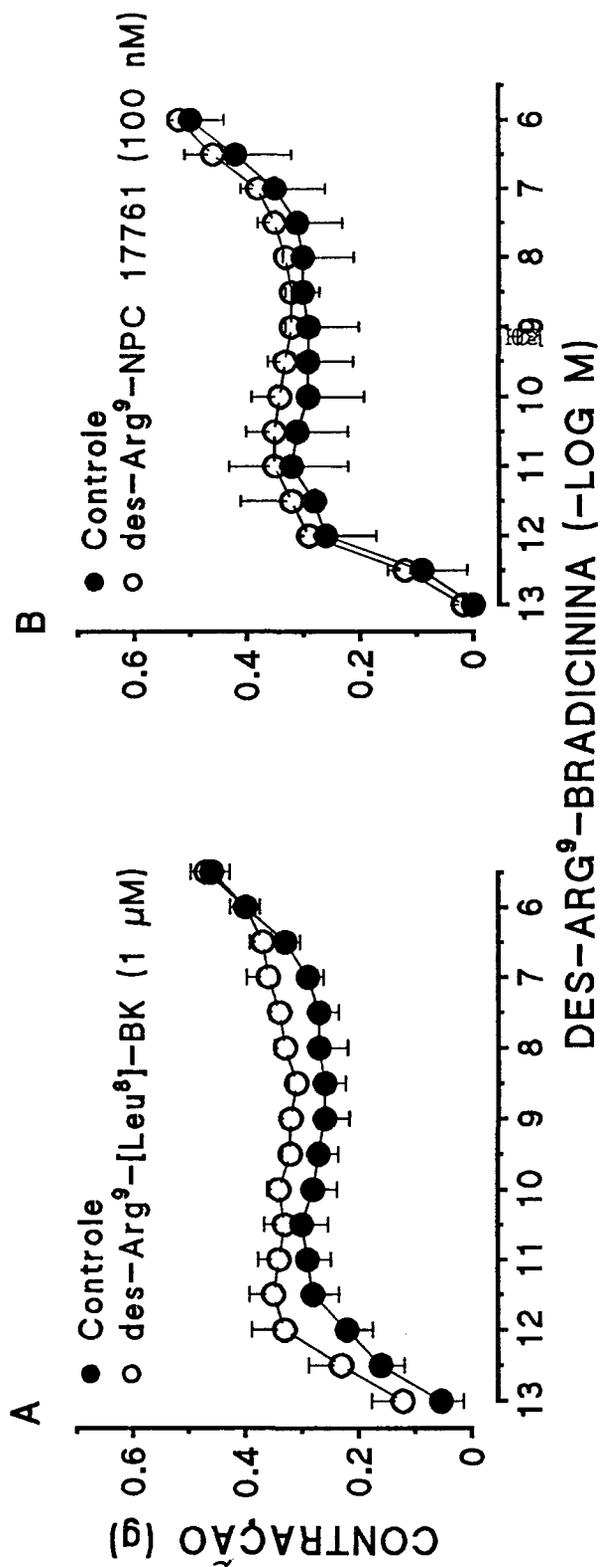


FIGURA 20 - Influência dos antagonistas seletivos de receptores do tipo B₁ sobre a resposta contrátil à des-Arg⁹-bradycininina da vesícula biliar isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 7 a 8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

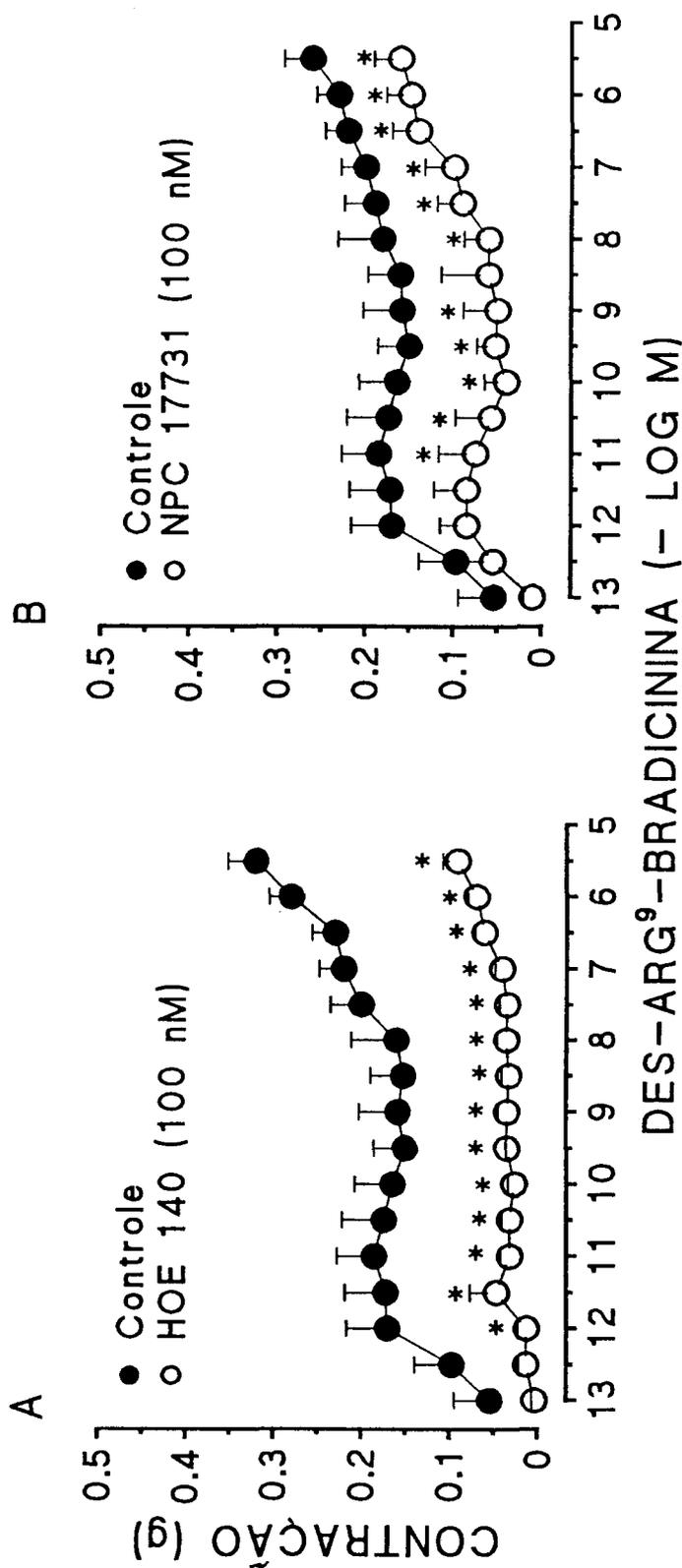


FIGURA 21 - Influência dos antagonistas seletivos de receptores do tipo B₂ sobre a resposta contrátil à des-Arg⁹-bradycininina da vesícula biliar isolada de cobaia. Cada ponto representa a média de 6 a 8 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Em alguns pontos, os erros padrão estão inseridos nos símbolos. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

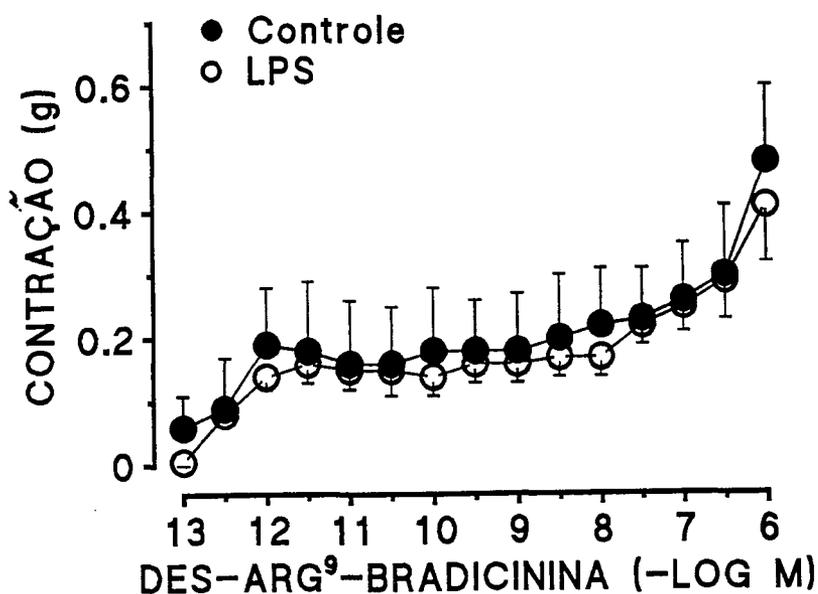


FIGURA 22 - Curvas concentração-resposta médias à des-Arg⁹-bradicinina na vesícula biliar isolada de cobaias controle ou tratadas previamente com LPS. Cada ponto representa a média de 7 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias. Todos os experimentos foram realizados após 6 h de equilíbrio das preparações.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Fundo de estômago de rato

Os presentes resultados confirmam e também estendem os dados iniciais descritos por Calixto e Medeiros (1992a), mostrando que a BK e o agonista seletivo de receptores B₁, a DABK, causaram resposta bifásica concentração-dependente no FER pré-contraído com BaCl₂, consistindo de relaxamento lento seguido de contração. A ordem de potência observada para esses efeitos é compatível com a presença de uma população heterogênea e constitutiva de receptores para as cininas, confirmando também os achados anteriores, indicando que o FER expressa ambos os receptores, B₁ e B₂ (Calixto e Medeiros, 1992a). Além disso, Calixto e Medeiros (1992a) demonstraram que, tanto o relaxamento quanto a contração induzidos pela DABK no FER, bem como o relaxamento induzido pela BK nesta preparação foram suprimidos após a retirada da mucosa das preparações. Entretanto, o efeito relaxante, tanto à BK quanto à DABK, reaparece de forma tempo-dependente, sugerindo, dessa forma, a síntese *de novo* dos receptores, provavelmente do tipo B₁.

Regoli e Barabé (1980) propuseram que os receptores das cininas podem ser classificados de acordo com a relação de potência de seus agonistas preparações de músculos lisos isolados. Assim, a ordem de potência, Lys-BK > [Tyr(Me)⁸]-BK ^ BK > Lys-DABK > DABK, observada, por exemplo, nas preparações de veia

jugular de coelho e na artéria carótida, é compatível com a presença de receptores B₂. Ao contrário, as preparações que expressam receptores B₁, como a aorta e a veia mesentérica de coelho, apresentam a seguinte relação de potência para as cininas: Lys-DABK > DABK > Lys-BK > BK > [Tyr(Me)¹]-BK. Assim, a ordem de potência encontrada para as cininas no FER não é compatível com as preparações contendo exclusivamente receptores B₁ ou B₂, indicando a provável existência de uma população heterogênea de receptores para as cininas. Resultados semelhantes indicam a presença de receptores B₁ e B₂ constitutivos para as cininas demonstrados em várias preparações de músculo liso, como por exemplo o duodeno isolado de rato (Boschov *et al.*, 1984), células endoteliais de aorta bovina (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Wiemer and Wirth, 1992), veia porta isolada de rato (Campos and Calixto, 1994), cólon proximal canino (Rangachari *et al.*, 1993), tecido ósseo de camundongos, fibroblastos de pulmão fetal humano (Goldstein e Wall, 1984) e também no dueto deferente isolado de camundongo onde modulam as contrações neurogênicas (Maas *et al.*, 1995).

A segunda ferramenta farmacológica utilizada para a caracterização dos receptores para as cininas no FER foi o emprego de antagonistas seletivos. Assim, utilizando antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂, como a des-Arg¹-NPC 17761 e o HOE 140, respectivamente, foi possível caracterizar farmacologicamente os subtipos de receptores responsáveis pelas respostas bifásicas mediadas pela BK e

DABK no FER. O HOE 140 é considerado um dos antagonistas seletivos mais potentes dos receptores B₂, tanto em experimentos *in vitro* (Hock *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1991; Wiemer e Wirth, 1992) quanto *in vivo* (Lembeck *et al.*, 1991; Wirth *et al.*, 1991). Nossos resultados mostram, através do emprego da análise de Schild, que o HOE 140 comportou-se como antagonista competitivo de natureza simples em relação às respostas mediadas pela estimulação dos receptores B₂ contra a resposta contrátil induzida pela BK no FER, apresentando valor de pA₂ de 9,05 ± 0,24 e coeficiente angular que não foi estatisticamente diferente da unidade (1,09) (Kenakin, 1993). O valor de pA₂ determinado para o HOE 140 contra a contração induzida pela BK no FER foi bastante semelhante àqueles descritos para este composto em preparações que também expressam receptores B₂, como, por exemplo, o íleo isolado de cobaia (8,4) (Hock *et al.*, 1991), taenia caeci (8,4) e traquéia isolada de cobaia (8,9) (Field *et al.*, 1992), duodeno isolado de rato (10,1) (Hall *et al.*, 1992), bexiga urinária isolada de cobaia (8,8) e de coelho (9,2) (Regoli *et al.*, 1992) e dueto deferente isolado de camundongo (9,6) (Maas *et al.*, 1995). Por outro lado, nas mesmas concentrações, o HOE 140 causou apenas discreto deslocamento à direita sobre a curva concentração-resposta relaxante à BK no FER, sugerindo que o mecanismo de ação envolvido no relaxamento à BK no FER, ao contrário do observado para a resposta contrátil, não parece ser mediado por ativação de receptores B₂.

Com o emprego do antagonista seletivo e potente para os receptores B₂, desenvolvido recentemente, a des-Arg⁸-NPC 17761, foi possível observar um deslocamento à direita, sem interferência com a resposta máxima, da CCR de relaxamento induzido pelo agonista seletivo de receptores B₂, a DABK. Contudo, a análise da regressão linear através do método proposto por Schild revelou que a des-Arg⁸-NPC 17761 não parece interagir com o receptor B₂ no FER através de um mecanismo competitivo de natureza simples, considerando que o coeficiente angular calculado pelo método de Schild (0,56) foi significativamente diferente da unidade (Kenakin, 1993). Também é interessante ressaltar que, apenas quando empregado em altas concentrações (1 pM) a des-Arg⁸-NPC 17761 deslocou à direita a CCR contrátil induzida pela DABK no FER. Tais resultados indicam que existem também diferenças marcantes com relação aos mecanismos de ação envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes mediadas pela DABK no FER. O antagonismo exercido tanto pelo HOE 140 como aquele produzido pela des-Arg⁸-NPC 17761 em relação à contração e o relaxamento induzidos pela BK e DABK, respectivamente, foram bastante seletivos. Assim, tanto as respostas induzidas pelo agonista seletivo dos receptores B₂, a DABK, quanto aquelas causadas pela BK, não foram afetadas pelo HOE 140 ou pelo des-Arg⁸-NPC 17761, respectivamente.

Após a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores para as cininas envolvidos na resposta bifásica no FER procurou-se estudar, com o emprego

de inibidores seletivos, alguns dos mecanismos de transdução envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes causadas pela BK e a DABK nesse tecido. A incubação das preparações com apamina, uma neurotoxina polipeptídica isolada do veneno da abelha, conhecida por bloquear seletivamente os canais de ativado por Ca^{2+} (Romey e Lazdunski, 1984), aboliu completamente as respostas relaxantes induzidas tanto pela BK quanto pela DABK. Resultados semelhantes foram observados para a BK na presença de apamina no duodeno isolado de rato, taenia caeci e bexiga urinária isoladas de cobaia, íleo isolado de cobaia, esfíncter esofageal isolado e na traquéia isolada de cobaia (Maggi *et al*, 1989; Den Hertog *et al*, 1988; Hall e Morton, 1991; Saha *et al*, 1991; Field *et al.*, 1994; Schlemper e Calixto, 1995). Em conjunto, tais resultados sugerem que tanto o relaxamento induzido pela BK quanto aquele causado pela DABK, apesar de serem mediados por receptores distintos, envolvem a participação de canais de K ativados por Ca^{2+} sensíveis à apamina. Além disso, foi também observado no presente trabalho, que a nicardipina, uma diidropiridina bloqueadora seletiva de canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis à voltagem (Bertolino, 1992), também inibiu o relaxamento causado pela BK e DABK sugerindo, dessa forma, a participação do influxo de Ca^{2+} extracelular através desses canais nos efeitos relaxantes induzidos tanto pela BK como pela DABK, no FER.

Resultados recentes descritos na literatura demonstraram que o óxido nítrico está intimamente envolvido no efeito relaxante do sistema não-adrenérgico não-

colinérgico em vários tecidos, incluindo o FER (Rand, 1992; Cullen e Kelly, 1993). Considerando que as respostas relaxantes causadas pelas cininas são também mediadas, direta ou indiretamente, por liberação de prostanóides, pela liberação de óxido nítrico (Cowan e Cohen, 1991; Berguer *et al.*, 1993; Schlemper e Calixto, 1994), foi também avaliado no presente trabalho se o relaxamento induzido pelas cininas no FER envolve a participação do óxido nítrico. A incubação das preparações com inibidores da síntese de óxido nítrico, como a L-NOARG e o L-NMMA, não alterou o relaxamento induzido tanto pela BK bem como pela DABK. Além disso, o azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel (Gruetter *et al.*, 1981; Ignarro *et al.*, 1986), não afetou significativamente a resposta relaxante à BK ou à DABK no FER. Resultados semelhantes foram relatados no duodeno de rato, onde a resposta contrátil e a relaxante induzidas pela BK não foram afetadas significativamente por drogas que inibem ou estimulam a síntese de óxido nítrico (Rhaleb e Carretero, 1994; Ozturk, 1994). Esses resultados mostram, portanto, que o relaxamento causado pelas cininas no FER não parece envolver a participação do óxido nítrico.

Existem também diversas evidências experimentais sugerindo o envolvimento dos produtos tanto da cicloxogenase quanto da lipoxigenase, nas ações causadas pelas cininas no trato gastrointestinal, no cólon de coelho, de cobaia (Musch *et al.*, 1982) e de rato (Diener *et al.*, 1988), íleo de rato, de coelho e de

cobaia *in vitro* (Smith *et al.*, 1988; Calixto e Medeiros, 1991). Entretanto, nossos resultados mostram que tais produtos não parecem estar envolvidos na resposta bifásica induzida pelas cininas no FER. O fato de as respostas bifásicas causadas pela BK e a DABK no FER não terem sido afetadas pela glibenclamida, sugere que elas também não estão associadas com a ativação dos canais de $Ca^{*^{\wedge}}$ sensíveis a ATP e bloqueados por essa sulfoniluréia. Por outro lado, nossos resultados também indicam que as ações das cininas no FER não parecem estar acopladas a processos relacionados com a ativação da PKC. Essas observações estão baseadas no fato de que tanto a estaurosporina como o H-7 não influenciaram nas respostas induzidas por esses peptídeos. Além disso, altas concentrações de forbol éster, um ativador seletivo dessa enzima (Nishizuka, 1984, 1986; Castagna *et al.*, 1992), que quando incubadas com os tecidos por longos períodos, desacoplam essa enzima, também não interferiram com as ações da BK e da DABK no FER. De forma interessante, as ações da BK em vários músculos lisos como a veia jugular isolada de coelho (Calixto e Medeiros, 1991), músculo circular do íleo isolado de cobaia (Calixto e Medeiros, 1992b) e cólon isolado de cobaia (Hasler *et al.*, 1995) foram inibidos pelos antagonistas da PKC, indicando uma possível diferença no mecanismo de transdução da resposta às cininas em função do tecido analisado. Trabalhos recentes de biologia molecular mostram que tanto os receptores B_1 quanto os B_2 apresentam em sua estrutura protéica sítios de fosforilação para a PKC e para a PKA

(McEachem *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992; Powell *et al.*, 1993; Eggerikx *et al.*, 1992; McIntyre *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1994; Menke *et al.*, 1994; Macneil *et al.*, 1995). Por outro lado, as respostas bifásicas para a BK e a DABK no FER parecem envolver uma ação direta a nível de musculatura lisa, não sendo afetadas por concentrações efetivas de drogas que bloqueiam receptores para vários neurotransmissores, como a histamina (tanto receptores H_1 como H_2), serotonina, fator de agregação plaquetária (PAF), neurocininas (NK_1 e NK_2), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) ou peptídeo intestinal vasoativo (VIP).

Com relação à fonte de Ca^{2+} envolvida na resposta bifásica induzida pelas cininas no FER, nossos resultados mostram que as respostas relaxantes induzidas pela DABK e BK foram completamente inibidas em meio sem Ca^{2+} ou na presença de nicardipina, mas não foram afetadas pelo $NI\dot{C}l_2$, um bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo T sensíveis à voltagem (Bertolino, 1992; Miljanich e Ramachandran, 1995). Esses resultados indicam que o relaxamento induzido pelas cininas nesta preparação, depende do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo L, mas não do tipo T. Ao contrário do relaxamento, parte da resposta contrátil induzida pelas cininas no FER depende do influxo de Ca^{2+} extracelular, mas esse efeito foi resistente a ambos os antagonistas de canais de Ca do tipo L ou do tipo T testados. Entretanto, boa parte da resposta contrátil induzida pela BK no FER parece depender da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares,

tendo em vista que a contração induzida pela BK não foi alterada, mesmo quando as preparações permaneceram por um longo período em meio sem Ca^{2+} contendo EGTA. A mesma independência do fluxo de Ca^{2+} extracelular foi demonstrada na contração induzida pela BK mediada por receptores B_2 no músculo circular de íleo isolado de cobaia (Calixto e Medeiros, 1991), na veia jugular isolada de coelho (Calixto e Medeiros, 1992b), íleo e bexiga urinária isolados de cobaia, dueto deferente e útero isolados de rato (Calixto, 1995), enquanto que para a contração mediada pela BK na traquéia de cobaia, foi demonstrado depender quase que exclusivamente da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Calixto, 1995). Ao contrário dos resultados do presente estudo, o relaxamento induzido pela BK na traquéia isolada de cobaia não foi afetado quando as preparações foram mantidas em solução sem Ca^{2+} , com ou sem rianodina, nem foi afetado pela nicardipina, embora tenha sido também sensível à apamina (Schlemper e Calixto, 1995). Nossos resultados, mostram que as ações relaxantes das cininas, dependendo do tecido analisado, podem envolver tanto Ca^{2+} de origem extracelular como intracelular.

Como descrito na parte introdutória, os receptores B_j para as cininas são raramente constitutivos, mas sua síntese pode ser estimulada por trauma tecidual ou durante processos inflamatórios (para revisão ver Marceau e Regoli, 1991; Hall, 1992; Marceau, 1995). Contudo, em alguns músculos lisos, os receptores B_j parecem ocorrer constitutivamente, como por exemplo, no duodeno isolado de rato

(Boschov *et al*, 1984), na veia porta isolada de rato (Campos e Calixto, 1994) e no dueto deferente isolado de camimdongo (Maas *et al.*, 1995[^]. Os presentes resultados mostram que o FER também contém receptores Bi constitutivos para as cininas, uma vez que o relaxamento induzido pela DABK, agonista seletivo de receptor Bj, e sua pequena resposta contrátil no FER foram evidenciadas logo após o término do período de equilíbrio das preparações, e permaneceram reproduzíveis por mais de seis horas após a montagem da preparação.

Uma característica muito importante a respeito das respostas mediadas pela ativação dos receptores B[^] é que elas podem ser induzidas após longo período de incubação *in vitro* ou através de vários procedimentos farmacológicos, como a aplicação de alguns agentes nocivos, como LPS e MDP, forbol acetato miristato, bem como por alguns fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidermal e fator de crescimento de célula endotelial (para revisão ver Hall, 1992; Marceau, 1995). Tais tratamentos induzem ou aumentam a resposta mediada pelos receptores Bi, já no primeiro momento após a montagem da preparação. A resposta contrátil à DABK em tecidos retirados de coelhos, é um exemplo de onde ocorre intensa síntese *de novo* desses receptores, seguindo o tratamento sistêmico com LPS, Nossos resultados mostram que o tratamento prévio dos animais com LPS de *E. coli*, 24 h antes, causou aumento significativo da resposta relaxante induzida pela DABK,

sem afetar, contudo, a resposta contrátil, associada com redução significativa do relaxamento causado pela BK.

Tais resultados sugerem, portanto, que o tratamento sistêmico dos animais com LPS aumenta a resposta mediada pelos receptores B₁, associado com redução do efeito relaxante, provavelmente mediado pelos receptores B₂. Resultados semelhantes envolvendo a síntese *de novo* dos receptores B₁ envolvidos nas respostas à DABK foram também demonstrados após o tratamento com LPS ou MDP, *in vivo* ou *in vitro*, ou com o emprego de algumas citocinas como a IL-1, IL-2, IL-6 ou com fatores de crescimento (Regoli *et al.*, 1981; Bouthillier *et al.*, 1987; deBlois e Marceau, 1987, deBlois *et al.*, 1989; Nwator e Whalley, 1989; Campos *et al.*, 1995; 1996). Além disso, a síntese *de novo* dos receptores B₁ para a DABK, quando induzida por agentes como LPS, MDP, IL-1 e IL-2, pode ser bloqueada por glicocorticóides, como é o caso da inibição da indução de receptores B₁ por sensibilização (Regoli *et al.*, 1978; Marceau *et al.*, 1980; Whalley *et al.*, 1983; Bouthillier *et al.*, 1987; deBlois *et al.*, 1988; Campos e Calixto, 1995; Campos *et al.*, 1995; 1996).

Em conclusão, esses resultados confirmam e estendem as observações iniciais descritas por Calixto e Medeiros (1992a), indicando que os mecanismos envolvidos na resposta bifásica para a BK e a DABK no FER diferem significativamente. A contração à BK parece ser mediada por ativação de receptores

B₂, sendo esse efeito antagonizado de maneira seletiva e puramente competitiva pelo HOE 140. Ao contrário, o relaxamento induzido pela BK no FER foi apenas parcial, embora significativamente, antagonizado pelo antagonista de receptores B₂, o HOE 140, não sendo, contudo, afetado pelo antagonista de receptores B₁, a des-Arg⁸-NPC 17761. Tais resultados sugerem que o efeito relaxante produzido pelas cininas no FER, parece envolver mecanismos distintos de ação. Por outro lado, a resposta relaxante induzida pela DABK no FER parece ser mediada através da ativação de receptores B₂, uma vez que o relaxamento causado pela DABK foi antagonizado de maneira seletiva pelo novo antagonista de receptores B₂, a des-Arg⁸-NPC 17761. Assim, nossos resultados mostram que o FER expressa ambos os receptores para as cininas, B₁ e B₂, mas o tratamento sistêmico dos animais com LPS aumentou significativamente o relaxamento à DABK e reduziu o relaxamento à BK. Apesar da BK e a DABK causarem relaxamento no FER por ativação de receptores distintos, suas ações estão associadas com a ativação de canais de K⁺ ativados por Ca²⁺, cujo fluxo de Ca²⁺ se dá via canais dependentes de voltagem do tipo L e sensíveis à nicardipina, como demonstrado no desenho esquemático proposto na figura 23. Ao contrário, a contração causada pela BK no FER depende tanto da mobilização dos estoques de Ca²⁺ extra quanto intracelulares.

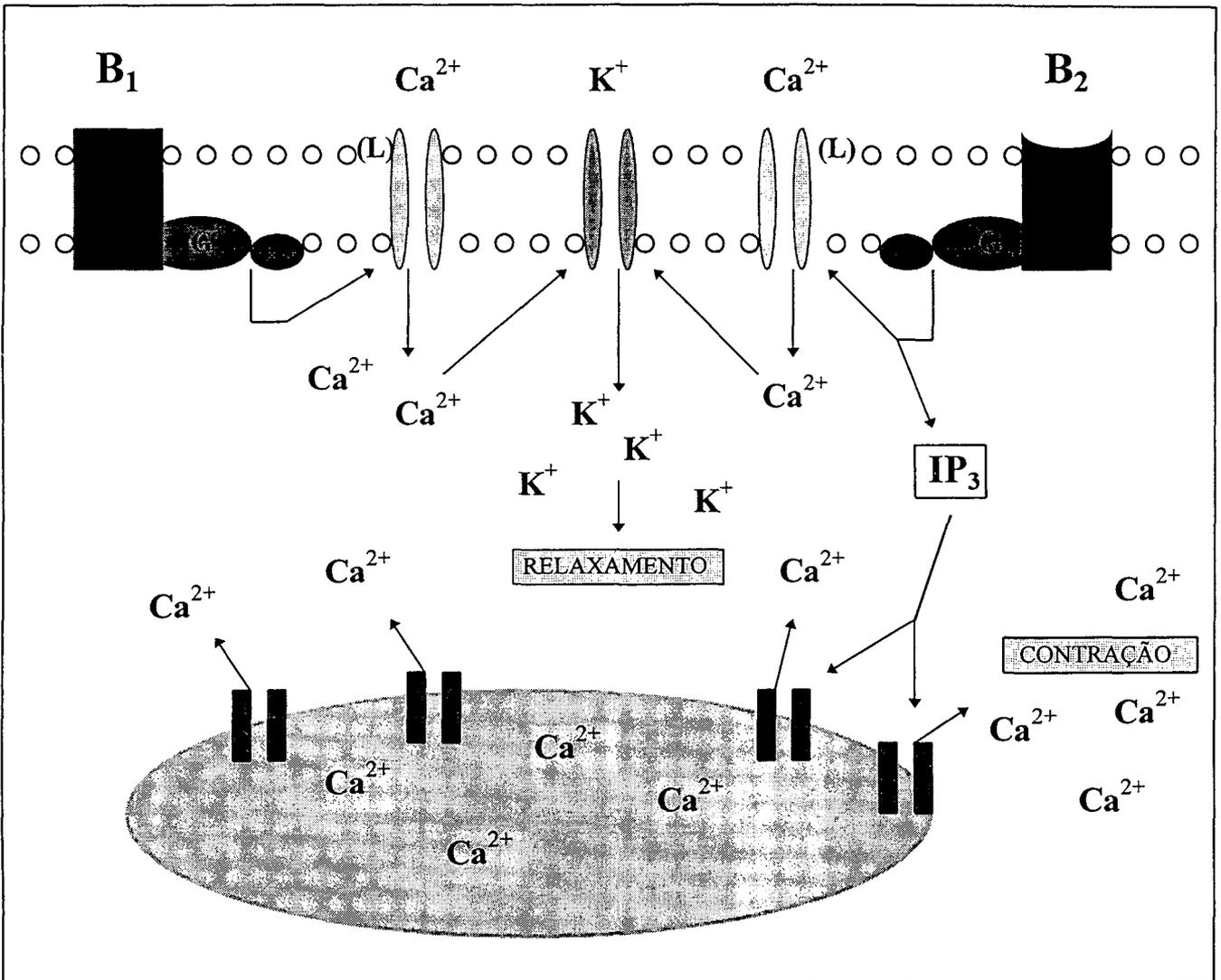


FIGURA 23 - Esquema proposto para explicar o mecanismo de transdução envolvido na resposta bifásica induzido pela BK e DABK no FER. Tanto o receptor B₁ quanto o receptor B₂ (ambos já clonados) fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína G. Algumas vezes podem encontrar-se acoplados a canais de Ca²⁺ do tipo L sensíveis à voltagem, podendo assim, indiretamente, ativar canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ sensíveis à apamina, causando hiperpolarização da membrana e relaxamento da musculatura lisa, como o observado no FER. Na maior parte das vezes as respostas mediadas por estes receptores envolvem a ativação da fosfolipase C, com conseqüente aumento dos níveis de inositol trifosfato (IP₃), liberando Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático e aumentando, em grande quantidade, os níveis de Ca²⁺ citoplasmático. Sendo que, no FER, esse mecanismo parece estar presente somente no efeito contrátil mediado pelo receptor B₂.

5.1 - Vesícula biliar de cobaia

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a BK e análogos causaram contração tônica concentração-dependente da VBC caracterizada por dois componentes distintos; de alta (0,1 pM a 1 nM) e de baixa afinidade (3 nM a 10 pM). A resposta contrátil à BK na VBC não foi afetada pela tetrodotoxina, glibenclamida, mepiramina, atropina, CP 96,345, WEB 2086 ou prazosin, indicando que a BK causa efeito miogênico direto na VBC, independente da liberação neuronal de histamina, acetilcolina, noradrenalina, taquicininas (receptores NK₁), do fator de agregação plaquetária ou pela ativação de canais de K⁺ sensíveis à ATP. Os resultados indicam também que as ações das cininas nesta preparação, são mediadas por ativação de receptores do subtipo B₂ no músculo liso. Essa conclusão está baseada em várias evidências farmacológicas oriundas do emprego de agonistas e antagonistas seletivos de receptores B₁ e B₂. Assim, com o uso de agonistas, foi possível estabelecer a ordem de potência para a BK e análogos, tanto para a primeira, quanto para a segunda fase da resposta. A ordem de potência obtida é compatível com a presença de receptores B₂ (Regoli e Barabé, 1980). Além disso, com o emprego de antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂, foi possível demonstrar que tanto o HOE 140 como o NPC 17761 e o NPC 17731, mas não a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, antagonista do receptor B₁, causaram deslocamento concentração-dependente à direita sobre a resposta contrátil à BK.

Entretanto, nossos resultados não nos permitem afirmar, através do gráfico de Schild, se a interação da BK com os receptores B₂ na VBC envolve mecanismo competitivo de natureza simples, uma vez que não foi possível atingir a resposta máxima à BK na presença dos antagonistas, devido à limitada concentração de BK disponível.

Recentemente, Falcone *et al.* (1993) demonstraram que a BK e análogos ligam com alta afinidade (K_d 0,45 nM) nos receptores B₂ obtidos de membranas de tecidos musculares na VBC. Além disso, os autores demonstraram também que a resposta contrátil à BK na VBC foi antagonizada competitivamente pelo NPC 17731, antagonista seletivo de receptores B₂. Ao contrário dos nossos resultados, o HOE 140 antagonizou de maneira não-competitiva a ligação da BK com os receptores B₂ nesta preparação (Falcone *et al.*, 1993). Além disso, os antagonistas do receptor B₂ como o NPC 567, NPC 17731, NPC 17761 e HOE 140 comportaram-se como antagonistas competitivos puros (coeficiente angular não diferente da unidade) em relação à contração induzida pela BK na VBC, apresentando valores de pK_b de 5,0; 7,2; 7,7 e 8,5, respectivamente. Os autores encontraram também valores semelhantes de pK_b para os mesmos antagonistas quando os experimentos foram conduzidos na presença de indometacina, que como demonstrado no presente estudo, diminuiu significativamente tanto a potência quanto a eficácia da resposta à BK na VBC. Tais resultados mostram que, as

respostas das cininas na VBC dependem de ações indiretas liberando prostanóides e de ações diretas na musculatura lisa. Curiosamente, Falcone *et al.* (1993) não encontraram nos seus estudos, a resposta de alta afinidade para a BK detectada no nosso trabalho. Entretanto, existem várias diferenças metodológicas entre os dois estudos, como por exemplo, a duração do período de equilíbrio das preparações, a tensão basal à que foram submetidas às preparações, a presença de diferentes drogas no banho, e o uso de capsaicina utilizada por Falcone *et al.* (1993) para reduzir a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

Está atualmente bem documentado, que muitas ações das cininas, mediadas pelos receptores B_2 , ocorrem indiretamente através da liberação de metabólitos derivados do ácido araquidônico (Gaginella e Kachur, 1989; Hall, 1992). Ao nível da VBC foi demonstrado que as ações das cininas são também mediadas, pelo menos em parte, por liberação de prostaglandinas, sendo seus efeitos antagonizados por inibidores da síntese de prostaglandinas, como a indometacina e o ibuprofeno (Baird e Margolius, 1989; Woods e Baird, 1991). Nossos resultados confirmam essas observações e demonstram que tanto a indometacina como o ibuprofeno foram capazes de antagonizar as respostas contráteis à BK. O fato de a contração induzida pela BK não ter sido antagonizada pelo dazoxiben, inibidor seletivo da síntese de TXA_2 (Randall *et al.*, 1981), ou pelo L-655,240, antagonista competitivo e seletivo dos receptores do TXA_2 (Hall *et al.*, 1987; Girard *et al.*..

1989), sugere que os metabólitos da cicloxigenase liberados pela BK na VBC provavelmente não estão relacionados com o TXA₂. Baseado na ordem de potência obtida para os prostanóides testados, pode-se sugerir que o principal prostanóide liberado após a metabolização do ácido araquidônico pela BK na VBC parece ser a PGE₂. Conclusão similar foi sugerida para explicar o aumento da secreção de bicarbonato pela BK na VBC (Baird e Margolius, 1989). Além disso, a contração induzida pela BK na VBC foi parcialmente inibida pela fenidona, sugerindo algum envolvimento dos metabólitos derivados da lipoxigenase na sua resposta contrátil. Entretanto, o MK 571, antagonista seletivo para os receptores do LTD₄ e LTE₄ (Jones *et al.*, 1989), que demonstrou ser ativo em inibir de maneira competitiva as contrações induzidas pelo LTD₄ na VBC (Freedman *et al.*, 1993), falhou em antagonizar a contração causada pela BK na VBC sugerindo, assim, que o LTD₄ não parece estar envolvido na contração induzida pela BK na VBC. A estimulação da fosfolipase A₂ com degradação do ácido araquidônico e liberação principalmente de produtos derivados da cicloxigenase pelas cininas foi também observada em outros músculos lisos como a traquéia isolada de cobaia (Schlemper e Calixto, 1994), duodeno isolado de rato (Griesbacher, 1992), fibroblastos gengivais humanos (Modéer *et al.*, 1990), células renais de cão (Slivka e Insel, 1988).

Com relação à fonte de Ca utilizada pela BK para induzir contração na VBC, nossos resultados indicam que tal efeito, depende basicamente da liberação de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. Assim, a remoção de Ca^{2+} da solução nutriente, bem como na presença de EGTA, ou, em Krebs normal, após incubação das preparações com nicardipina, não foram capazes de inibir a contração induzida pela BK na VBC. Contudo, a adição de rianodina, alcalóide que interfere com a liberação de Ca^{2+} intracelular (McPherson e Campbell, 1993) nas preparações mantidas em meio sem Ca^{2+} , inibiu de maneira concentração-dependente e significativa a resposta contrátil à BK na VBC.

Está amplamente demonstrado que a estimulação da fosfolipase C, que atua sobre o fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, resultando no aumento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares ou de diacilglicerol que estimula a PKC constituem mecanismos comuns nas ações das cininas. Em muitos tecidos as cininas são capazes de gerar tanto aumento de inositol fosfato como gerar diacilglicerol (Farmer e Burch, 1992; Hall, 1992). Além disso, no músculo longitudinal (Ranson *et al.*, 1992) e circular do íleo isolados de cobaia (Calixto e Medeiros, 1991) e na aorta e veia jugular isoladas de coelho (Calixto e Medeiros, 1992b), na veia porta isolada de rato (Campos e Calixto, 1994) as ações da BK dependem da ativação da PKC. O mesmo foi observado por Falcone *et al.* (1993) na VBC onde a BK produziu hidrólise de fosfoinositídeos nas células com

conseqüente aumento de IP_3 e DAG. Contudo, a resposta contrátil causada pela BK na VBC, em nosso estudo, não foi afetada nem pela estaurosporina nem pelo H-7, dois antagonistas da PKC (veja para revisão Hidaka e Kobayashi, 1992). No entanto, nas mesmas concentrações, esses antagonistas da PKC inibiram as ações das cininas em outros músculos lisos como, por exemplo, no íleo de cobaia, no dueto deferente de rato, na traquéia de cobaia e no útero de rato (Calixto, 1995) e no FER (presente estudo). Assim, experimentos adicionais são necessários para a confirmação do papel da PKC na resposta contrátil à BK na VBC.

Com o objetivo de investigar a possível presença de receptores B_j na VBC, foram também realizados experimentos adicionais para a DABK, agonista seletivo dos receptores B_j na presença de vários antagonistas. Os resultados obtidos indicam que a DABK induziu contração tempo-dependente e com grande afinidade, mas com baixa eficácia na VBC. A potência obtida para a DABK foi compatível àquela observada para a primeira fase da resposta à BK, mas apresentou eficácia de cerca de 10%, quando comparada à BK. O aumento tempo-dependente da resposta à DABK foi completamente inibido pela cicloheximida, inibidor da síntese protéica, quando esta foi mantida durante as seis horas em contato com as preparações. Efeito semelhante foi observado na aorta e na artéria mesentérica isoladas de coelho, bexiga urinária, veia porta e duodeno isolados de rato, bem como no edema de pata de rato, nos quais a cicloheximida demonstrou

ser capaz de inibir o aparecimento espontâneo de receptores B_j (Regoli *et al.*, 1978; Boutillier *et al.*, 1987; Altinkurt e Ozturk, 1990; Campos e Calixto, 1995; Campos *et al.*, 1996). Resultados semelhantes foram descritos na aorta de coelho com o emprego de outras drogas que atuam ao nível da síntese protéica, como a actinomicina (inibidor da síntese de RNA), brefeldin A (inibidor da translocação protéica) e tunicamicina (inibidor da glicosilação) (Audet *et al.*, 1994). Entretanto, o tratamento prévio dos animais com LPS não alterou a resposta contrátil à DABK na VBC, sugerindo a ausência dos receptores B[^] nas ações das cininas nesse tecido.

Um dado interessante do presente estudo foi a observação de que o HOE 140 e o NPC 17731, ambos antagonistas de receptores B₂, mas não a des-Arg[^]-[Leu⁸]-BK e a des-Arg⁹-NPC 17761, antagonistas seletivos de receptores B_j, foram efetivos em antagonizar a resposta contrátil à DABK na VBC. Tais resultados sugerem fortemente, que a contração causada pela DABK na VBC parece decorrer da ativação de receptores B₂ e não B_j. Resultados semelhantes foram descritos para a DABK em células endoteliais bovinas, onde o HOE 140 antagonizou a DABK (Weimer e Wirth, 1992). Também semelhante ao observado para a BK, a contração causada pela DABK na VBC foi quase que totalmente abolida pela indometacina ou pelo ibuprofeno, sugerindo a mediação indireta por liberação de produtos derivados da cicloxigenase. Contudo, tanto a fenidona como

o MK 531, que não afetaram a contração à BK na VBC, inibiram significativamente a contração causada pelo DABK nesta preparação. Esses resultados sugerem, que a contração induzida pela DABK na VBC depende em grande parte, da liberação de metabólitos derivados da lipoxigenase, através da ativação de receptores B_2 sensíveis ao HOE 140, NPC 17731 e ao NPC 17761. Esses resultados confirmam, portanto, as evidências descritas na literatura indicando a completa ausência de receptores B_j em cobaia (Hall, 1992; Marceau, 1995).

Quanto ao mecanismo de transdução, a contração induzida pela DABK na VBC é totalmente dependente de Ca^{2+} extracelular, em parte através de canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis à voltagem. Contudo, como descrito para a BK, as ações da DABK não parecem envolver a ativação da PKC. Portanto, as ações da DABK na VBC são diferentes do que se observa normalmente em respostas mediadas por receptores B_j como, por exemplo, na aorta de coelho, onde a DABK induz contração dependente da ativação da PKC, bem como, de estoques extra e intracelulares (Calixto e Medeiros, 1992b; Levesque *et al*, 1993). Entretanto, ao contrário do que foi observado para a BK, a resposta contrátil à DABK na VBC envolve também a participação dos derivados da lipoxigenase, além da liberação de prostanóides da via da cicloxigenase. Esse efeito da DABK de liberando prostanóides também foi observado na aorta e na artéria mesentérica isoladas de

coelho (Beny *et al.*, 1987; Tropea *et al.*, 1993) e fibroblastos gengivais humanos (Lemer e Modéer, 1991).

Resumindo, apresentamos evidências funcionais no presente estudo demonstrando que as contra es de alta e de baixa afinidades induzidas pelas cininas na VBC, são mediadas por ativa o dos receptores B₂ ao nível da musculatura lisa. Além disso essa resposta depende da libera o de Ca²⁺ dos estoques intracelulares sensíveis   rianodina. Já para o agonista de receptores B₁, a DABK causa contra o com grande afinidade mas com baixa eficácia na VBC através da ativa o de receptores B₂, um efeito totalmente dependente da mobiliza o de Ca²⁺ extracelular. Por outro lado, parte das contra es induzidas pela BK ou pela DABK   provavelmente mediada indiretamente pela libera o produtos derivados do ácido araquid nico, não relacionados ao TXA₂. As contra es induzidas tanto pela BK quanto pela DABK não parecem depender do envolvimento da PKC. Considerando-se que os metabólitos do ácido araquid nico desempenham papel relevante no processo inflamatório na vesícula biliar (Kaminski e Deshpande, 1980; Thomell *et al.*, 1981; Kaminski *et al.*, 1985; Kaminski, 1989; Myers e Bartula, 1992), e também o fato de que a BK apresenta importante a o pr -inflamatória (Marceau *et al.*, 1983; Proud e Kaplan, 1988), além de estimular a secre o eletrog nica de bicarbonato na VBC (Baird e

Margolius, 1989), parece provável que as cininas desempenhem papel fisiopatológico importante ao nível do sistema biliar.

RESUMO

1 - No presente estudo foram analisados, através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis e relaxantes para as cininas no fundo de estômago de rato e na vesícula biliar de cobaia *vitro* ”.

2 - A bradicinina (BK), a des-Arg¹-bradicinina (DABK) e cininas relacionadas causaram resposta bifásica no fundo de estômago de rato (FER), consistindo de relaxamento seguido de contração, nas preparações pré-contraídas com cloreto de bário (BaCl₂). As respostas máximas para o relaxamento e para a contração induzidas pelas cininas no FER não diferiram significativamente, com exceção da contração induzida pela DABK, a qual correspondeu a apenas cerca de 47 % daquela causada pela BK e demais peptídeos. O antagonista seletivo de receptor B₂, HOE 140 (3 a 30 nM) produziu deslocamento paralelo à direita da curva concentração-resposta (CCR) contrátil à BK fornecendo valor de pA₂ de $9,07 \pm 0,27$, com coeficiente angular não diferente da unidade (0,99). Contudo, o HOE 140 causou apenas discreto deslocamento à direita da CCR relaxante à BK, sem afetar, contudo, a resposta bifásica à DABK. O antagonista seletivo de receptor B₁, a des-Arg¹-NPC 17761 (10 nM a 1 μ M) causou deslocamento significativo à

direita da CCR relaxante apresentando valor de pA_2 de $8,35 \pm 0,05$, com coeficiente angular significativamente diferente da unidade (0,59), mas não afetou a CCR contrátil à DABK, ou a resposta bifásica induzida pela BK.

3 - As respostas relaxantes induzidas pela BK e DABK (100 nM) foram quase que completamente inibidas pela apamina (1 μ M) ou pela nicardipina (1 nM), mas não foram afetadas por inibidores da síntese de óxido nítrico, pelo azul de metileno, inibidores da cicloxigenase ou lipoxigenase, por antagonistas seletivos para receptores de histamina (H_1 e H_2), nicotina, fator ativador de plaquetas (PAF), taucicinas (NK_1 e NK_2), peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (CGRP), peptídeo vasoativo intestinal (VIP), ou pelo bloqueador nicotínico ganglionar (tetraetilamônio). Já os relaxamentos induzidos pela BK e DABK foram reduzidos em meio sem Ca^{2+} contendo EGTA, sendo que a contração induzida pela BK foi mais resistente. O tratamento prévio dos animais com endotoxina de *Escherichia coli* (LPS, 10 μ Lig/animal, i.v.), 24 horas antes, potencializou o relaxamento induzido pela DABK, sem interferir, contudo, com a contração a esse peptídeo, além de ter causado redução do relaxamento à BK.

4 - A adição de BK e demais cininas (0,1 pM a 3 μ M) na vesícula biliar de cobaia (VBC) após duas horas de equilíbrio, causou contração caracterizada por dois

componentes distintos: de alta (0,1 pM a 1 nM) e de baixa afinidade (3 nM a 3 μ M). A ordem de potência observada para a primeira fase (CE_{50} , pM) foi: BK (1,36) = Hyp¹-BK (1,44) = Lys-BK (1,54) > Tyr^{*}-BK (2,12) > Met-Lys-BK (4,30). A ordem de potência para a segunda fase (CE_{50} , nM, a concentração necessária para causar 50 % da resposta relativa ao KCl 80 mM) foi: Hyp¹-BK (8,95) > Met-Lys-BK (12,78) > Tyr¹-BK (33,75) > Lys-BK (60, 92) > BK (77,35). A resposta contrátil (g de tensão) obtida para 3 μ M (a maior concentração utilizada) foi: Hyp¹-BK $1,76 \pm 0,09$; BK $1,65 \pm 0,12$; Lys-BK $1,45 \pm 0,13$; Tyr^{*}-BK $1,36 \pm 0,15$ e Met-Lys-BK $1,36 \pm 0,15$. Já o agonista seletivo para receptores B₂, a DABK, causou apenas pequena contração ($0,21 \pm 0,05$ g), que correspondeu à cerca de 10 % da resposta induzida pela BK. A adição de prostaglandina (PG) E₂, PGE₂ ou do tromboxanomimético U46619 (100 pM a 100 μ M), causou contração concentração-dependente na VBC com as seguintes CE_{50} : 3,1 μ M; 1,7 μ M e 0,47 nM e respostas máximas de $1,36 \pm 0,15$; $1,32 \pm 0,20$ e $0,96 \pm 0,09$ g, respectivamente.

5 - A contração induzida pela BK na VBC foi inibida pela indometacina (3 μ M) e pelo ibuprofeno (30 μ M), e foi parcialmente reduzida pela fenidona (30 μ M), mas não foi afetada pela atropina (1 μ M), nicardipina (1 μ M), em meio sem Ca^{2+} mais EGTA, na presença de dazoxiben (30 μ M), L 655,240 (10 nM, antagonista seletivo

de receptores de tromboxano A_2), MK 571 (100 nM, antagonista seletivo para receptores de leucotrieno D_4 e E_4), tetrodotoxina (300 nM), CP 96,345 (300 nM, antagonista de receptor NK_2), mepiramina (1 μ M), glibenclamida (1 μ M), H-7 (3 μ M), estaurosporina (100 nM) ou forbol éster (1 μ M). Contudo, em meio sem Ca^{2+} mais rianodina (10 μ M), a resposta à BK foi significativamente reduzida.

6 - Os antagonistas seletivos para o receptor B_2 , o HOE 140, o NPC 17761 e o NPC 17731 (10 nM a 1 μ M), causaram deslocamento à direita da CCR à BK de modo concentração dependente, enquanto que o antagonista seletivo para o receptor B_1 , a des-Arg¹-[Leu⁵]-BK (1 μ M), não afetou a resposta contrátil à BK.

7 - A contração induzida pela DABK (1 pM a 1 μ M) na VBC aumentou significativamente em função do tempo em que as preparações permaneceram em equilíbrio antes da adição das drogas, atingindo valores máximos ao final de 6 horas (CE_{50} de 16, 4 pM e resposta máxima de $0,6 \pm 0,08$ g). O aumento tempo-dependente da resposta contrátil à DABK foi bloqueado pela cicloheximida (70 μ M, inibidor da síntese protéica). As respostas à DABK foram inibidos ainda pela indometacina (3 μ M), ibuprofeno (30 μ M), fenidona (30 μ M), ou em solução sem Ca^{2+} contendo EGTA, mas foi somente parcialmente afetado pelo MK 571 (100

nM) ou pela nicardipina ($1 \mu\text{M}$). No entanto, a resposta à DABK não foi afetada pelo dazoxiben ($30 \mu\text{M}$), estaurosporina (100 nM) ou L 655,240 ($1 \mu\text{M}$).

8 - A resposta contrátil à DABK na VBC não foi afetada pelos antagonistas seletivos de receptor B_1 , des-Arg¹-[Leu⁵]-BK ($1 \mu\text{M}$) ou des-Arg¹-NPC 17761 (100 nM), porém, foi quase que completamente inibida pelo HOE 140 ou NPC 17731 (100 nM). O tratamento prévio dos animais com LPS (30 p.g/animal , i.v., 24 horas antes) não alterou significativamente a contração à DABK na VBC.

9 - Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que o FER expressa ambos os receptores, B_1 e B_2 , para as cininas. A contração induzida pela BK decorre da ativação de receptores B_2 , enquanto que o relaxamento induzido pela DABK parece ser mediado apenas por receptores B_1 . Tanto os receptores B_1 quanto os B_2 são constitutivos, mas o tratamento prévio dos animais com LPS causou aumento da resposta mediada por receptores B_1 , e redução daquela mediada por receptores B_2 . Além disso, o relaxamento causado pelas cininas no FER depende da ativação de canais de potássio modulados por Ca^{2+} e de canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis à voltagem. Os resultados sugerem também que as respostas da VBC à BK, mediadas tanto por sítios de alta quanto de baixa afinidade, envolvem a ativação direta dos receptores B_2 , e dependem da liberação

de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis à rianodina. Tanto a contração induzida pela BK quanto a da DABK na VBC, dependem da liberação de eicosanóides pro-inflamatórios derivados do ácido araquidônico via cicloxigenase, mas não dependem do tromboxano A_2 , ou da ativação de mecanismos dependentes da proteína quinase C. Finalmente, a contração induzida pela DABK na VBC aumenta em função do tempo de equilíbrio das preparações, através de um mecanismo que envolve a síntese protéica, sendo esse efeito mediado por ativação de receptores B_2 , mas não B_1 . Ao contrário do que foi observado para a BK, a contração induzida pela DABK na VBC é essencialmente dependente do fluxo de Ca^{2+} extracelular, parcialmente através de canais do tipo L.

A maioria destes resultados foi publicado no British Journal of Pharmacology 114; 1549-1556,1995 ou estão contidos em trabalho aceito para publicação no Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996.

ABSTRACT

1 - This study investigated, by the use of selective agonists and antagonists, the receptor subtypes involved in, and also some of the mechanisms underlying, kinin-mediated relaxant or contractile responses in the rat stomach fundus (RSF) and guinea pig gallbladder *in vitro*.

2 - Bradykinin (BK), des-Arg¹-BK (DABK) and related kinins caused biphasic responses (BR), i.e. relaxation followed by contraction, in RSF precontracted with BaCl₂. The maximal developed biphasic responses for kinins in RSF did not differ significantly, with the exception of the contraction caused by DABK which was significantly lower when compared with other agonists, corresponding to c. a. 47 % of that caused by BK and related peptides. The selective B₂ receptor antagonist HOE 140 (3 to 30 nM) produced parallel rightward shifts of the contractile concentration-response curve (CRC) for BK, yielding a pA₂ value of 9.07 ± 0.27 and slope of 0.99, but caused only a slight rightward shift of the relaxant CRC for BK, leaving the CRCs to the B₁ receptors of DABK unaffected. The selective B₁ receptor antagonist, des-Arg¹-NPC 17761 (10 nM to 1 μ M), caused graded rightward shifts of the relaxant CRCs, but did not affect the contractile CRCs for DABK, yielding a

pA_2 value of 8.35 ± 0.05 and slope significantly lower than unity (0.59), having no effect on BK-induced BR.

3 - BK and DABK (100 nM)-induced relaxations were almost suppressed by apamin (1 pM) or by nicardipine (1 nM), but were unaffected by nitric oxide synthase inhibitors, methylene blue, both lipo- and cyclo-oxygenase inhibitors, selective receptor antagonists for histamine (H_1 and H_2), nicotine, platelet activating factor, tachykinins (both NK_1 and NK_2), calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide or a nicotinic ganglion blocking agent. However, both BK and DABK-mediated relaxations were reduced in Ca^{2+} -free medium plus EGTA, while BK-mediated contraction was more resistant. *E. coli* endotoxin treatment (LPS, 10 μ g/animal), 24 h prior, potentiated DABK-induced relaxation, but not contraction, and reduced BK-mediated relaxation ($P < 0.05$).

4 - Addition of BK and related kinins (0.1 pM - 3 μ M) after 2 h of equilibration of the guinea pig gallbladder (GPG) caused graded contractions characterized by two distinct phases: high affinity (0.1 pM to 1 nM) and low affinity (3 nM to 3 μ M). The rank order of potency for the first phase (mean EC_{50} , pM) was: BK (1.36) = Hyp³-BK (1.44) = Lys-BK (1.54) > Tyr¹-BK (2.72) > Met-Lys-BK (4.30) The rank order of potency for the second phase (mean EC_{50} , nM, at a concentration producing 50%

of the contraction caused by 80 mM KCl) was: Hyp⁺-BK (8.95) > Met-Lys-BK (12.78) > Tyr⁺-BK (33.75) > Lys-BK (60.92) > BK (77.35). The contractile responses (gram of tension) to 3 μ M of BK (the highest concentration tested) were: Hyp⁺-BK, 1.76 ± 0.09 ; BK, 1.65 ± 0.12 ; Lys-BK, 1.45 ± 0.13 ; Tyr⁺-BK, 1.36 ± 0.15 and Met-Lys-BK, 1.36 ± 0.15 . The selective B₁ agonist DABK caused only a weak contraction with maximal response (0.21 ± 0.05 g), which corresponds to approximately 10 % of that induced by BK, suggesting the presence of B₁ receptors. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ or U46619 (0.1 nM to 100 μ M), caused concentration-dependent contractions in GPG with mean EC₅₀s of 3.1 μ M; 1.7 μ M and 0.47 nM and maximal responses of 1.36 ± 0.15 ; 1.32 ± 0.20 and 0.96 ± 0.09 g, respectively.

5 - BK-induced contraction in GPG was inhibited by indomethacin (3 μ M) or ibuprofen (30 μ M), and was partially reduced by phenidone (30 μ M) and nicardipine (1 μ M), but was not affected by atropine (1 μ M), Ca²⁺-free medium plus EGTA, dazoxiben (30 nM), L 655,240 (10 nM, a selective receptor antagonist of TXA₂), MK-571 (0.1 μ M, a selective leukotriene D₄ and E₄ receptor antagonist), tetrodotoxin (0.3 μ M), CP 96,346 (0.3 μ M, a NK₁ receptor antagonist), mepyramine (1 μ M), glibenclamide (1 μ M), H-7 (3 μ M), staurosporine (100 nM), or phorbol

ester (1 μ M). However, BK-induced contractions in GPG maintained in Ca⁻ free medium were markedly attenuated by ryanodine (10 μ M).

6 - The selective B₂ receptor antagonists, HOE 140, NPC 17731 and NPC 17761 (10 nM to 1 μ M), caused concentration-dependent displacements to the right of the contractile concentration-response curve for BK. The selective B₁ receptor antagonist, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μ M), did not affect BK-induced GPG contraction.

7 - Contractions induced by DABK in GPG (1 pM to 1 μ M) increased significantly as a function of time elapsed after setting up the preparation, reaching the maximum after 6 h of equilibration (EC₅₀ 16.4 pM and Emax 0,6 ± 0,08 g). DABK-induced contraction in GPG was completely inhibited in the presence of cycloheximide (70 μ M, an inhibitor of protein synthesis), indomethacin (3 μ M), ibuprofen (30 μ M), phenidone (30 μ M) or Ca²⁺-free medium plus EGTA, and was partially reduced by MK 571 (0.1 μ M) or by nifedipine (1 μ M), but was not affected by dazoxiben (30 μ M), staurosporine (100 nM) or L 655,240 (1 μ M).

8 - In addition, DABK-induced contraction in GPG was unaffected by the selective B₁ receptor antagonists des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK and des-Arg⁹-NPC 17761. However, the selective B₂ receptor antagonists HOE 140 and NPC 17731 completely blocked

DABK-mediated contraction. The pretreatment of animals with LPS (30 µg/animal, i.v., 24 h) did not significantly change the DABK-induced contraction in GPG.

9 - It is concluded that RSF expresses both B_1 and B_2 receptors. BK-induced contraction involves activation of B_2 receptors, while DABK-induced relaxation is mediated by B_1 receptors. Both B_1 and B_2 receptors in RSF are constitutive, but LPS treatment caused upregulation of B_1 and downregulation of B_2 receptors. Kinin-mediated relaxation in RSF are coupled to activation of Ca^{2+} -activated channels and rely on Ca^{2+} influx via L-type voltage-sensitive channels. In GPG, responses to BK seems to be mediated via B_2 receptors with both high and low affinity for the peptide, and the BK-mediated contraction in GPG depends on the release of intracellular Ca^{2+} sources sensitive to ryanodine. In addition, both BK and DABK-induced contractions in GPG are mediated by release of proinflammatory eicosanoid(s) derived from the cyclo-oxygenase pathway from arachidonic metabolism unrelated to TXA_2 , and do not seem to be coupled to activation of a protein kinase C-dependent mechanism. It is also concluded that DABK-induced contraction in GPG increases as a function of the equilibrium period of the preparation by a mechanism dependent on protein synthesis, and seems to be mediated by activation of B_2 , but not B_1 receptors. In contrast to that observed for

BK, the contraction induced by DABK is dependent on the influx of extracellular Ca^{2+} , partially through L-type calcium channels.

Most of these results have been published in British Journal of Pharmacology 114: 1549-1556, 1995 or have been included in manuscript accepted for publication in the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996 (in press).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOUS, J.E. e BARDIER, E. Les substances hypotensives de Turine humaine normale. *C.R. Seances Soc. BioL*, **66**: 511-520, 1909.
- ACEVEDO, C.G., LEWIN, J., CONTRERAS, E. e HUIDOBRO-TORO, J.P. Bradykinin facilitates the purinergic motor component of the rat bladder neurotransmission. *A/ewroícż. Lett.*, **113**: 227-232, 1990.
- ALTINKURT, O. e OZTXJRK, Y. Bradykinin receptors in isolated rat duodenum. *Peptides*, **11**: 39-44, 1990.
- ARUNLAKSHANA, O. e SCHILD, H.O.: Some quantitative uses of drug antagonists. *5r. J Pharmacol*, **14**: 48-58, 1959.
- AUDET, R., PETITCLERC, E., DRAPEAU, G., RIOUX, F. e MARCEAU, F. Further analysis of the upregulation of bradykinin Bi receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. *Eur. J. Pharmacol*, **271**: 551-555, 1994.
- BAIRD, A.W. e MARGOLIUS, H.S. Bradykinin stimulates electrogenic bicarbonate secretion by the guinea-pig gall-bladder. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **248**: 268-272, 1989.
- BARABÉ, J., DROUIN, J.-N., REGOLI, D. e PARK, W.K. Receptors for bradykinin in intestinal and uterine smooth muscle. *Can. J Physiol. Pharmacol*, **55**: 1270-1285, 1977.
- BARANIUK, J.N., LUNDGREN, J.D., MIZOGUCHI, H., GAWIN, A., MERIDA, M., SHEL TAMER, J.J. e KALINER, M.A. Bradykinin and respiratory mucous membranes. *yl. Rev. Respir. Dis.*, **141**: 706-714, 1990.
- BARBIUK, C., MARCEAU, F., ST-PIERRE, S. e REGOLI, D. Kininases and vascular responses to kinins. *Eur. J. Pharmacol*, **78**: 167-174, 1982.

- BENY, J.L., BRUNET, P. e HUGGEL, H. Interaction of bradykinin and des-Arg¹-bradykinin with isolated pig coronary arteries: mechanical and electrophysiological *tvQnXs*,. *Regul. Peptides*, 17: 181-190, 1987.
- BERGUER, R., HOTTENSTEIN, O.D., PALEN, T.E., STEWART, J.M. e JACOBSON, E.D. Bradykinin-induced mesenteric vasodilation is mediated by B₂ subtype receptors and nitric oxide. *Am. J. Physiol*, 264: G492-G496, 1993.
- BERTOLINO, M. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 32: 399-421, 1992.
- BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D. e WORTHY, K. Bioregulation of kinins, kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44: 1-80, 1992.
- BOISSONNAS, R.A., GUTTMANN, S. e JAQUENOUD, P.A. Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia*, 16: 326-355, 1960.
- BORKOWSKI, J.A., RANSOM, R.W., SEABROOK, G.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.G., STRADER, C.D. e HESS, J.F. Targeted disruption of a B₂ bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol. Chem.*, 270: 13710-13710, 1995.
- BOSCHOV, P., PAIVA, A.C., PAIVA, T.B. e SHIMUTA, S.I. Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for the biphasic effect in the rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, 83: 591-600, 1984.
- BOUTHILLIER, J. DEBLOIS, D. e MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg¹-bradykinin in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 257-264, 1987.
- BURCH, R.M., FARMER, S.G. e STERANKA, L.R. Bradykinin receptor antagonists. *Med. Res. Rev.*, 10: 237-269, 1990.

- BURCH, R.M., KYLE, DJ. e STORMENN, T.M. Transduction of bradykinin signals, in : Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors, eds. R.M. Burch and R.G. Austin (Landes Co.), p.33-52, 1993.
- CALIXTO, J.B.: Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea-pig smooth muscles *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol*, **281**: 279-288, 1995.
- CALIXTO, J.B. e MEDEIROS, Y.S.: Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guineapig ileum. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **259**: 659-665, 1991.
- CALIXTO, J.B. e MEDEIROS, Y.S.: Bradykinin-induced biphasic response in the rat isolated stomach flindus: functional evidence for a novel bradykinin receptor. *Life Sci.*, **50**: PL47-PL52, 1992a.
- CALIXTO, J.B. e MEDEIROS, Y.S.: Effect of protein kinase C and calcium on bradykinin-mediated contractions of rabbit vessels. *Hypertension*, **19**: II87-II93, 1992b.
- CAMPBELL, D.J., KLADIS, A. e DUNCAN, A.-M. Bradykinin peptides in kidney, blood and other tissues of the rat. *Hypertension*, **21**: 155-165, 1993.
- CAMPBELL, W., YONEZU, K., SHINOHARA, T. e OKADA, H. An arginine carboxypeptidase generated during coagulation is diminished or absent in patients with rheumatoid arthritis. *J.Lab. Clin. Invest.*, **115**: 610-612, 1990.
- CAMPOS, A.H. e CALIXTO, J.B.: Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: mediation by B₁ and B₂ receptors. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **268**: 902-909, 1994.
- CAMPOS, M.M. e CALIXTO, J.B.: Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *J. Pharmacol*, **113**, 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M., MATA, L.V. e CALIXTO, J.B.: Expression of B₁ receptors mediating paw oedema and formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids. *Can. J. Physiol Pharmacol*, **61**: 329-332, 1995.

- CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P. e CALIXTO, J.B. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁸-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J Pharmacol.*, 117:, 1996 (no prelo).
- CARRETERO, O.A. e SCICLI, A.G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine and paracrine) in hypertension. *Hypertension*, 18 (Suppl. I): 158-169, 1991.
- CARRETERO, O.A., CARBINI, L.A. e SCICLI, A.G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and the mouse gene family. *J. Hypertens.*, 11: 693-697, 1993.
- CASTAGNA, M., TAKAZ, Y., AKAZ, K, KAIBUCFFI, S.K., KIKKAWA, U. e NISHIZLHKA, Y. Direct activation of calcium activated phospholipid dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.*, 257: 7847-7851, 1992.
- CHURCHILL, L. e WARD, P.E. Relaxation of isolated mesenteric arteries by des-Arg⁸-bradykinin stimulation of B₁ receptors. *Eur. J Pharmacol*, 130: 11-18, 1986.
- COCHRANE, C.G., REVAK, S.D. e WUEPPER, K.D. Action of Hageman factor in solid and fluidphages. *J. Exp. Med.*, 138: 1564-1583, 1973.
- COLLIER, O.H. & LEE, I.R. Nociceptive responses of guinea pigs to intradermal injections of bradykinin and kallidin-10. *Br. J Pharmacol.*, 21: 151-160, 1963.
- COWAN, C.L. e COHEN, R.A. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J Physiol*, 261: H830-H835, 1991.
- CULLEN, J.J. e KELLY, K.A. Gastric motor physiology and pathophysiology. In *Motility disorders of the gastrointestinal tract*. vol. 73, n 6, 1993.
- D'ORLÉANS-JUSTE, P., DE MJCCI, G. e VANE, J.R. Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 96: 920-926, 1989.

- DAMAS, J., BOURDON, V., REMACLE-VOLON, G. e ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carragenin and zymosan in rats. *Br. J. Pharmacol*, 101: 418-422, 1990.
- DEBLOIS, D. e MARCEAU, F. The ability of des-Arg⁸-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired during in vitro incubation. *Eur. J Pharmacol*, 142: 141-144, 1987.
- DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. e MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁸-bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, 93: 969-977, 1988.
- DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. e MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg⁸-bradykinin *in vivo* and *in vitro*. *Immunopharmacology*, 17: 187-198, 1989.
- DEBLOIS, D., BOUTILLIER, J. e MARCEAU, F. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg⁸-bradykinin: possible role of interleukin-1. *JBP Pharmacol.*, 103: 1057-1066, 1991.
- DEN HERTOOG, A., NELEMANS, A. e VAN DEN AKKER, J. The multiple action of bradykinin on smooth muscle of guinea-pig taenia caeci. *Eur. J. Pharmacol*, 151: 357-363, 1988.
- DIENER, M., BRIDGES, R.J., KNOBLOCH, S.F. e RUMMEL, W. Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. *Naunyn-Schiedberg's Arch. Pharmacol*, 337: 74-78, 1988.
- DRAY, A. e PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends. Neurosci.*, 16: 99-104, 1993.
- EGGERIKX, D., RASPE, E., BERTRAND, D., VASSART, G. e PARMENTIER, M.: Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1306-1313, 1992.

- ELLIOT, D.F., LEWIS, G.P. e HORTON, E.W. The structure of bradykinin - a plasma kinin from blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 3: 87-91, 1960.
- ERDŐS, E.C. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 15: S20-S24, 1990.
- ERDŐS, E.G. e SLOANE, E.M. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem. Pharmacol*, 11: 585-592, 1962.
- FALCONE, R.C., HUBBS, S.J., VANDERLOO, J.D., PROSSER, J.C., LITTLE, J., GOMES, B., AHARONY, D. e KRELL, R.D. Characterization of bradykinin receptors in guinea pig gall bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266: 1291-1299, 1993.
- FARMER, S.G. e BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 32: 511-536, 1992.
- FARMER, S.G. e BURCH, R.M. The pharmacology of bradykinin receptors. In: *Bradykinin Antagonists. Basic and clinical Research*, pp. 1-31, Burch, R.M. (ed.) Maree Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1991.
- FIELD, J.L., BUTT, J.K.M., MORTON, I.K.M. e HALL, J.M.: Bradykinin B₂ receptors and coupling mechanisms in the smooth muscle of guinea-pig taenia caeci. *Br. J. Pharmacol*, 113: 607-613, 1994.
- FIELD, J.L., HALL, J.M. e MORTON, I.K.M. Putative novel bradykinin BK₃ receptors in the smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci and trachea. In: *Recent progress on kinins*, vol.38AI, pp. 540-545, Bonner, G., Fritz, H., Unger, T.H., Roscher, A. & Luppertz, K. (eds.) Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1992.
- FLEMING, W.W., WESTFALL, D.P., DE LA LANDE, I.S. e JELLETT, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J Pharmacol Exp. Ther.*, 181: 339-343, 1972.

- FRANZ, M. e MENSE, S. Muscle receptors with group IV afferent responding to application of bradykinin. *Brain Res.*, 92: 369-383, 1975.
- FREEDMAN, S.M., WALLACE, J.L. e SHAFFER, E.A. Characterization of leukotriene-induced contraction of the guinea-pig gallbladder *in vitro*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71: 145-150, 1993.
- GAGINELLA, T.S. e KACHUR, J.F. Kinins as mediators of intestinal secretion. *Am. Physiol Soc.*, G1-G15, 1989.
- GIANMNI, G., CLEMMENT, E. e CECI, R. Expression of a ryanodine receptor-Ca²⁺ channel that is regulated by TGF- β . *Science*, 257: 91-101, 1992.
- GIRARD, Y., YOAKIM-RANCOURT, C., HAMEL, P., GILLARD, J.W., GUINDON, Y., LETTS, G., EVANS, J., LÉVEILLÉ, C., ETHIER, D., LORD, A., JONES, T., MASSON, P., FORD-HUTCHINSON, A. W. e ROKACH, J. Tetrahydrocarbazol-1- acetic acids: New class of thromboxane receptor antagonists. In: *Prostaglandins in Clinical Research: Cardiovascular System*. pp. 585-589. Alan R. Liss, Inc., New York., 1989.
- GOLDSTEIN, R.H. e WALL, M. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg¹-bradykinin. *J. Biol. Chem.*, 259: 9263-9268, 1984
- GRIESBACHER, T. Kinin-induced relaxations of the rat duodenum. *Naunyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 346: 102-107, 1992.
- GRUETTER, C.A., KADOWITZ, P.J. e IGNARRO, L.J. Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite, and amyl nitrite. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59: 150-156, 1981.
- GUIMARÃES, C.L., CALIXTO, J.B. e RAE, G.A. Potent constrictor actions of endothelin-1, endothelin-2 and endothelin-3 in rat isolated portal vein. *Hypertension*. 19: II79-II86, 1992.
- HALL, J.M. e MORTON, I.K.M. Bradykinin B₂ receptor evoked K^+ permeability increase mediates relaxation in the rat duodenum. *Eur. J. Pharmacol.*, 193: 231-238, 1991.

- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, 56: 131-190, 1992.
- HALL, J.M., CAULFIELD, M.P., WATSON, S.P. e GUARD, S. Receptor subtypes or species homologues. Relevance to drug discovery. *Trends Pharmacol Sei.*, **14**: 376-384, 1993.
- HALL, J.M., MITCHELL, D., CHIN, S.Y., FIELD, J.L., EVERETT, C.M. e MORTON, L.K.M. Differences in affinities of bradykinin B₂-receptor antagonists may be attributable to species. *Neuropeptides*, 22: 28-29, 1992.
- HALL, R.A., GILLARD, J., GLÍNDON, Y., LETTS, G., CHAMPION, E., ETHIER, D., EVANS, J., FORD-HUTCMNSON, A. W., FORTIN, R., JONES, T. R., LORD, A., MORTON, H. E., ROKACH, J. e YOAKIM, C. Pharmacology of L-655,240 (3- [1- (4-chlorobenzyl)- 5- fluoro- 3- methyl- indol- 2- yl] 2, 2-dimethylpropanoic acid), a potent, selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 135: 193-201, 1987.
- HARGREAVES, K.M., TROULLOS, E.S., DIONNE, R.A., SCHIMIDT, E.A., SHAFER, S.C. e JORIS, J.L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin. Pharmac. Ther.*, **44**: 613-621, 1988.
- HASLER, W.L., KUROSAWA, S., TAKAHASHI, T., FENG, H., GAGINELLA, T.S. e OWYANG, C. Bradykinin acting on B₂ receptors contracts colon circular muscle cells by IP₃ generation and adenylate cyclase inhibition. *J. Pharmacol. Exp Ther.*, 273: 344-350, 1995.
- HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., MACNEIL, T., STONESIFER, G.Y., FRAHER, J. e STRADER, C.D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.*, **45**: 1994.
- HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., YOUNG, G.S., STRADER, C.D. e RANSOM, R. W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 260-268, 1992.

HIDAKA, H. e KOBAYASHI, R. Pharmacology of protein kinase C inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 377-397, 1992.

HOCK, F.J., WIRTH, K., ALBUS, U., LINZ, W., GERHARDS, H.J., WIEMER, G., HENKE, ST., BREIPORHL, G., KONIG, W., KNOLLE, J. e SCHOLKENS, B.A. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.*, 102: 769-773, 1991.

HUIDOBRO-TORO, J., HERREROS, R. e PINTO-CORRADO, A. Pre- and postsynaptic bradykinin responses in rat vas deferens: asymmetric distribution of the postsynaptic effect. *Eur. J. Pharmacol.*, 121: 305-311, 1986.

IGNARRO, L.J., HARBISON, R.G., WOOD, K.S. e KADOWITZ, P.J. Dissimilarities between methylene blue and cyanide on relaxation and cyclic GMP formation in endothelium-intact intrapulmonary artery caused by nitrogen oxide-containing vasodilators and acetylcholine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 30-36, 1986.

JACOBSEN, S. Separation of two different substrates for plasma kinin-forming enzyme. *Nature*, 210: 98-99, 1966.

JONES, T. R., ZAMBONI, R., BELLEY, M., CHAMPION, L., CHARETTE, L., FORD-HUTCHINSON, A. W., FRENETTE, R., GAUTHIER, J-Y., LEGER, S., MASSON, P., McFARLANE, C. S., PIECHUTA, H., ROKACH, J., WILLIAMS, H., YOUNG, R.N., DEHAVEN, R. N. e PONG, S.S. Pharmacology of L-600, 711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D₄ receptor antagonist. *Can.J.Physiol.Pharmacol*, 67: 17-28, 1989.

KAMINSKI, D. L. e DESHPANDE, Y. G. Evaluation of the prostaglandins in canine bile flow, *Prostaglandins.*, 20: 367-372, 1980.

KAMINSKI, D. L. Arachidonic acid metabolites in hepatobiliary physiology and disease. *Gastroenterology.*, 97: 781-792, 1989.

KAMINSKI, D. L., DESHPANDE, Y. G., QUALY, J. e THOMAS, L. The role of prostaglandins in feline experimental cholecystitis. *Surgery.*, 98: 760-768, 1985.

- KAPLAN, A.P., REDDIGARI, S. e BRUNNEE, T. Studies of the activation and inhibition of the plasma kallikrein-kinin system. *Agents Actions*, 38: 317-328, 1992.
- KENAKIN, T.P.: Mechanisms of drug action and receptor classification. In: Pharmacological analysis of drug-receptor interaction. ed. Kenakin, T.P. 2nd ed., pp. 344-384. New York, Raven Press, 1993.
- KRAUT, H., FREY, E.K. e WERLE, E. Der nachweis eines krieslaufhormons in der pankreasdruse. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 189: 97-106, 1930.
- LEMBECK, F., GRIESBACHER, T., ECKHARDT, M., HENKE, S., BREIPOHL, G. e KNOLLE, J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br. J Pharmacol*, 102: 297-304, 1991.
- LERNER, U.H. e MODÉER, T. Bradykinin B₁ and B₂ receptor agonists synergistically potentiate interleukin-1-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Inflammation*, 15: 427-436, 1991.
- LEVESQUE, L., DRAPEAU, G., GROSE, J.H., RIOUX, F. e MARCEAU, F. Vascular mode of action of kinin B₁ receptors and development of a cellular model for the investigation of these receptors. *Br. J. Pharmacol*, 109: 1254-1262, 1993.
- LINZ, W., GABRIELE, W., GOHLKE, P., UNGER, T. e SCHÖLKENS, B.A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 47: 25-49, 1995.
- LLONA, I., GALLEGUILLOS, X., BELMAR, J. e HUIDOBRO-TORO, J.P. Bradykinin modulates the release of noradrenaline from vas deferens nerve terminais. *Life Sei.*, 48: 2585-2592, 1991.
- LLONA, L, VAVREK, R., STEWART, J. e HUIDOBRO-TORO, J.P. Identification of pre- and postsynaptic bradykinin receptor sites in the vas deferens: evidence for structural prerequisites. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 241: 608-614, 1987.

- MAAS, J., RAE, G.A., HUIDOBRO-TORO, J.P. e CALIXTO, J. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. *Br. J Pharmacol.* 114, 1471 - 1477, 1995.
- MACNEIL, T., BIERILO, K.K, MENKE, J.G. e HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B-1 receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1264: 223-228, 1995.
- MAGGI, C.A., PATACCHINI, R., SANTICIOLI, P., GEPPETTI, P., CECCONI, R., GIULIANI, S. e MELI, A. Multiple mechanisms in the motor responses of the guinea-pig isolated urinary bladder to bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, 98: 619-629, 1989.
- MANDLE, R.Jr., COLMAN, R.W. e KAPLAN, A.P. Identification of prekallikrein and HMW-kininogen as a circulating complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA*, 73: 4179-4183, 1976.
- MARCEAU, F. e REGOLI, D. Kinin receptors of the B₁ type and their antagonists. In: Bradykinin antagonists, basic and clinical aspects. Eds. Burch, R.M. and Dekker, M., New York. pp. 33-49, 1991.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30: 1-26, 1995.
- MARCEAU, F., BARABÉ, J., ST-PIERRE, S. e REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 58: 536-542, 1980.
- MARCEAU, F., LUSSIER, A. e ST. PIERRE, S. Selective induction of cardiovascular responses to des-Arg¹-bradykinin by bacterial endotoxin. *Pharmacology*, 29: 70-74, 1984.
- MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D. e GIROUD, J. Pharmacology of the kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gew. Pharmacol*, 14: 209-229, 1983.
- MARGOLIUS, H.S. Kallikreins and kinins. *Hypertension*, 26: 221-229, 1995.

- MCEACHERN, A.E., SHELTON, E.R., BHAKTA, S., OBERNOLTE, R., BACH, C., ZUPPAN, P., FUJISAKA, J., ALDRICH, R.W. e JARNAGIN, K. Expression cloning of a rat B₂ receptor. *Proc. Nat. Acad. Sei. U.S.A.*, 88: 7724-7728, 1991.
- MCINTYRE, P., PHILLIPS, E., SKIDMORE, E., BROWN, M. e WEBB, M. Cloned murine bradykinin receptor exhibits a mixed B₁ and B₂ pharmacological sensitivity. *Molec. Pharmacol*, 44: 346-355, 1993.
- MCPHERSON, P.S. e CAMPBELL, K.P. The ryanodine receptor calcium release channel. *J. Biol. Chem.*, 268: 13765-13768, 1993.
- MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERILO, K.K., MACNEIL, T., DERRICK, A.W., SCHNECK, K.A., RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L. e HESS, J.F.: Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, 269: 21583-21586, 1994.
- MILJANICH, G.P. e RAMACHANDRAN, J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol*, 35: 707-734, 1995.
- MODÉER, T., LJUNGGREN, O. e LERNER, U.H. Bradykinin-2 receptor-mediated release of [³H]arachidonic acid and formation of prostaglandin E₂ in human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.*, 25: 358-363, 1990.
- MUSCH, M.W., MILLER, R.J., FIELD, M. e SIEGEL, M.I. Stimulation of colonic secretion by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Science*, 217: 1255-1256, 1982.
- MYERS, S. I. e BARTULA, L. Human cholecystitis is associated with increased gallbladder prostaglandin I₂ and prostaglandin E₂ synthesis. *Hepatology.*, 16: 1176-1179, 1992.
- NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233: 305-311, 1986.
- NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308: 693-698, 1984.

- NWATOR, LA. e WHALLEY, E.T.: Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of des-Arg⁸-BK (kinin B₁) receptors in vivo. *Eur. J. Pharmacol*, 160: 125-132, 1989.
- OZTURK, Y. Effects of the agents affecting cyclic nucleotide metabolism on the bradykinin- and des-Arg⁸-bradykinin-induced relaxations and contractions in isolated rat duodenum. *Gen. Pharmacol*, 25: 1389-1395, 1994.
- PERKINS, M.N., BURGESS, G.M., CAMPBELL, E.A., HALLET, A., MURPHY, R.J., NAEEM, S., PATEL, LA., PATEL, S., RUEFF, A. e DRAY, A. HOE 140: a novel bradykinin analogue that is a potent antagonist at both B₁ e B₂ receptors in vitro. *BrPharmacol*, 102: 171-179, 1991.
- PETITCLERC, E., ABEL, S., DEBLOIS, D. POUBELLE, P.E. e MARCEAU, F. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on three types of responses to interleukin-1 in rabbit isolated blood vessels. *J. Cardiovas. Pharmacol*, 19: 821-829, 1992.
- PIERCE, J.V. e GUIMARÃES, J.A. Further characterization of highly purified human plasma kininogens. In: Pisano, J.J., Austen, K.F, (eds): Chemistry and Biology of the kallikrein-kinin system in health and disease. U.S. government Printing Office, Washington, D. C., pp. 121-127, 1977.
- POWELL, S.J., SLYNN, G., THOMAS, C., HOPKINS, B., BRIGGS, L & GRAÍLAIVÍ, A. Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics*, 15: 435-438, 1993.
- PROUD, D., BAUMGARTEN, C.R., NACLEIRO, R.M. e WARD, P.E. Kinin metabolism in human nasal secretions during experimentally induced allergic rhinitis. *J. Immunol*, 138: 428-434, 1987.
- PROUD, D. e KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Rev Immunol* 6: 49-83, 1988.

- RAND, M.J.: Nitrgenic transmission: nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Physiol Pharmacol*, 19: 147-169, 1992.
- RANDALL, M.J., PARRY, M.J., HAWKESWOOD, E., CROSS, P.E. e DICKESÍSON, R.P. UK-37,248, a novel, selective thromboxane synthetase inhibitor with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity. *Thromb. Res.*,23: 145-162, 1991.
- RANGACHARI, P.K., BEREZIN, M. e PRIOR, T. Effects of bradykinin on the canine proximal colon. *Regul. Pept.*, 46: 511-522, 1993.
- RANSON, R.W., GOODMAN, C.B. e YOUNG, G.S. Bradykinin stimulation of phosphoinositide hydrolysis in guinea-pig ileum longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol*, 105: 919-924, 1992.
- REGOLI, D. e BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 32: 1-46, 1980.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., ROVERO, P., DION, S., RHALEB, N.-E., BARABÉ, J. D'ORLÉANS-JUSTE, P. e WARD, P. Conversion of kinins and their antagonists into Bj receptor activators and blockers in isolated vessels. *Eur. J. Pharmacol*, 127: 219-224, 1986.
- REGOLI, D., JUKIC, D., GOBEIL, F. e RHALEB, N.-E. Receptors for bradykinin and related kinins: a criticaí analysis. *Can. J Physiol Pharmacol*, 71: 556-567, 1993.
- REGOLI, D., JUKIC, D., TOUSIGNANT, C. e RHALEB, N.-E. Kinin receptor classification. In: Recent progress on kinins, vol. 38/1, pp. 475-485, Bonner, G., Fritz, H., Unger, T.H. Roscher, A. & Luppertz, K. (eds.) Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1992.
- REGOLI, D., MARCEAU, F. e BARABÉ, J. *De novo* formation of vascular receptors for bradykinin. *Can. J. Physiol Pharmacol*, 56: 674-677, 1978.

- REGOLI, D., RHALEB, N.-E., DRAPEAU, G e DION, S. Kinin receptor subtypes. *J Cardiovasc. Pharmacol*, 15: S30-S38, 1990.
- REGOLI, D.C., MARCEAU, F. e LAVIGNE, J. Induction of B₁-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol*, 71: 105-115, 1981.
- RHALEB, N.E. e CARRETERO, O.A. Role of B₁ and B₂ receptors and nitric oxide in bradykinin-induced relaxation and contraction of isolated rat duodenum. *Life Sci*, 55: 1351-1363, 1994.
- RPIÁLEB, N.E., DION, S., BARABÉ, J., ROUISSI, N., JUKIC, D., DRAPEAU, G. e REGOLI, D. Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur. J Pharmacol*, 162: 419-427, 1989.
- ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T. e ROSENFELD, G.: Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol* 156: 261-273, 1949.
- ROMEY, G. e LAZDUNSKI, M. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca²⁺-dependent K⁺ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118: 669-674, 1984
- SAHA, J.K., SENGUPTA, J.N. e GOYAL, R.K. Effect of bradykinin on opossum longitudinal smooth muscle: evidence for novel bradykinin receptors. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 252: 1012-1020, 1990.
- SAHA, J.K., SENGUPTA, J.N. e GOYAL, R.K. Effects of bradykinin and bradykinin analogs on the opossum lower esophageal sphincter: characterization of an inhibitory bradykinin receptor. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 259: 265-273, 1991.

- SAWUTZ, D.G., SALVINO, J.M., DOLLE, R.E., CASIANO, F., WARD, S.J., HOUCK, W.T, FAUNCE, D.M., DOUTY, B.D., BAIZMAN, E., AWAD, M.M.A., MARCEAU, F. e SEOANE, P.R. The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist. *Proc. Natl Acad. Sei. U.S.A.*, 91: 4693-4697, 1994.
- SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogenases). A group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacol. Rev.*, 31: 1-17, 1980.
- SCHLEMPER, V. e CALIXTO, J. B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 111: 83-88, 1994.
- SCHLEMPER, V. e CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the relaxant response of bradykinin in epithelium intact strips of the guinea pig trachea. *Eur. J. Pharmacol*, 282: 177-184, 1995.
- SHARMA, J.N. e BUCHANAN, W.W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp.Toxicol. Pathol*, 46: 421-433, 1994.
- SLIVKA, S.R. e INSEL, P.A. Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 263: 14640-14647, 1988.
- SMITH, P.LL., MONTZKA, P.D., MCCAFFERTY, G.P., WASSERMAN, M.A. e FONDACARO, J.D. Effects of the sulfidopeptide leukotrienes LTD₄ and LTE₄ on ileal ion transport in vitro in the rat and rabbit. *Am. J. Physiol*, 255: G168-G174, 1988.
- STERANKA, L.R. e BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pain and inflammation. In: *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinical Research*, pp. 191-211, Burch, R.M. (ed.) Mareei Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1991.

STERANKA, L.R., MANNING, D.C, DEHAAS, C.J., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., CONNOR, J.R., VAVREK, R.J., STEWART, J.M. e SNYDER, S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natu. Acad. Sei. U.S.A.*, 85: 3245-3249, 1988.

SUGIHARA, M., TODOKI, K. e OKABE, E. The contractile responses of isolated ligal arteries from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide via the stimulation of B₁ receptors for kinins. *Folia. Pharmacol. Jpn.*, 98: 63-71, 1991.

SUZUKI, K., ABICO, T. e ENDO, N. Synthesis of every kind of peptide fragments of bradykinin. *Chem. Pharmacol. Buli.*, 17: 1671-1678, 1969.

SZOLCSÁNYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J. Physiol*, 388: 9-23, 1987.

THORNELL, E., JANSON, R. e SVANVIK, J. Indomethacin intravenously: A new for effective relief of biliary pain. *Surgery*, 90: 468-476, 1981.

TROPEA, M.M., GUMMELT, D., HERZIG, M.S. e LEEB-LUMBERG, L.M.F. B₁ and B₂ kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg⁸-bradykinin and bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264: 930-937, 1993.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Techniques for making dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 143: 299-330, 1963.

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

WANG, Y.X., GAVRAS, I., LAMMEK, B., BRESNAHAN, M. e GAVRAS, H. Effects of bradykinin and prostaglandin inhibition on systemic and regional hemodynamics in conscious normotensive rats. *J. Hypert*, 9: 805-812, 1991.

- WEBB, M, MCINTYRE, P. e PHILLIPS, E. B₁ and B₂ bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs. *J. Neurochem.*, 62: 1247-1253, 1994.
- WERLE, E. e BEREK, U. Zur kenntnis des kallikreins. *Z Angew. Chem.*, 60A: 53, 1948.
- WERLE, E. e MAIER, L. Uber die chemische und pharmakologische unterscheidung von kailikreinen verschieden herkunft. *Biochem: Z*, 323: 279-288, 1952.
- WERLE, E., GOTZE, W. e KEPPLER, A. Uber die wirkung des kallikreins auf den isolieren darm und uber eine neue darkontrahierende substanz. *Biochem. Z*, 289: 217-233, 1937.
- WHALEY, E.T., FRITZ, H. e GEIGER, R. Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbit basilar arteries. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 324: 296-301, 1983.
- WIEMER, G. e WIRTH, K. Production of cyclic GMP via activation of B₁ and B₂ kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 262:729-733, 1992.
- WIRTH, K., HOCK, F.J., ALBUS, U., LINZ, W., ALPERMANN, H.G., ANAGNOSTOPOULOS, H., HENKE, ST., BREIPOHL, G., KONIG, W., KNOLLE, J. e SCHÖLKENS, B.A. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vivo* studies. *Br. J Pharmacol*, 102: 774-777, 1991.
- WOODS, M. e BAIRD, A.W. Increased responsiveness of guinea-pig gallbladder to kinin. *Br. J. Pharmacol* 104: 141P, 1991.
- ZETLER, G. e KAMPMANN, E. An attempt to differentiate the effects of angiotensin II, substance P and bradykinin on the field-stimulated guinea-pig vas deferens. *Eur. J Pharmacol*, 56: 21-29, 1979.