

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

**CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR E DOS MECANISMOS  
RELACIONADOS À RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA  
PELA des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina NO MODELO MURINO DE PLEURISIA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre em Farmacologia.

Prof. Orientador: Dr. João B. Calixto.

**ROSE MARI JACOBESSEN VIANNA  
Florianópolis  
1998**

VIANNA, Rose Mari. *Caracterização do receptor e dos mecanismos relacionados à resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina no modelo murino de pleurisia*. Florianópolis, 1998, 142f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 09/06/98

Caracterização do receptor B<sub>1</sub> e dos mecanismos relacionados à resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina na cavidade pleural de camundongos. Os resultados mostram que a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina causa resposta inflamatória caracterizada por um pico de 1h para o extravasamento e um pico de 4 h para a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais. Nesta resposta inflamatória estão envolvidos vários mediadores inflamatórios, entre eles, as taucininas, o CGRP, o óxido nítrico, e produtos das ciclooxigenases. O tratamento prévio dos animais com LPS não aumentou a expressão dos receptores B<sub>1</sub> na cavidade pleural de camundongos, sugerindo que estes receptores estão presentes na sua forma constitutiva.

[inflamação],(des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina],[óxido nítrico],[CGRP], [taucininas],[prostanóides]

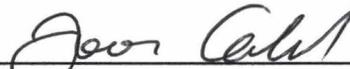
**“CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR E DOS MECANISMOS  
RELACIONADOS À RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA  
PELA DES-ARG<sup>9</sup>-BRADICININA NO MODELO MURINO DE  
PLEURISIA”**

**POR**

**ROSE MARI JACOBSEN VIANNA**

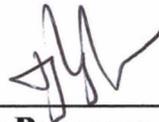
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pela Banca Examinadora em  
sessão de defesa pública em 09 de Junho  
de 1998.**

**Banca Examinadora:**



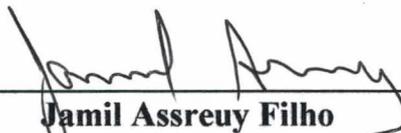
---

**João Batista Calixto  
(FMC/UFSC-Membro-Titular)**



---

**João Bosco Pesquero  
(EPM/UNIFESP-Membro Titular)**



---

**Jamil Assreuy Filho  
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



---

**Prof. Dr. Giles Alexander Rae  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 09 de Junho de 1998.**

*Dedico esse trabalho para o meu  
filho, Pedro, pelo seu amor e  
carinho, por tornar tudo mágico e  
que, apesar de sua tenra idade, já  
soube desenvolver a arte da  
paciência.*

*Agradecimento*

*Ao Walter, pela compreensão e  
companheirismo durante todos esses  
anos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João B. Calixto, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo, e pelo estímulo na realização deste trabalho.

A todos os professores do Mestrado em Farmacologia e da Coordenadoria Especial de Farmacologia, em especial à Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau e ao Prof. Anicleto Poli, por terem me recebido no seu laboratório, proporcionando-me a primeira oportunidade de trabalhar na área de Farmacologia Experimental.

Ao Prof. Giles Alexander Rae, pelo apoio, pelo estímulo e por ter selecionado criterioso e carinhosamente a Turma/96.

A todos os funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo carinho e atenção dispensados em todo esse período, em especial ao Roberto, Sr. Zeri, Sr. Joãozinho, Sandra, Adenir, Elza, Juarez, Regina, Rita e Gorette.

À Rosana Ostroski, e à Patrícia Vianna pela assessoria.

Aos meus colegas de turma, por ordem *cronológica*, Prof. Gilboé, Prof. Rubens, Dr. Marcos, Profa. Josélia, Profa. Irinéia, Profa. Tânia, Martha e Sandro, quer sejam pelas suas experiências profissionais ou pela amizade e carinho dispensados, tornaram esse Curso ainda mais enriquecedor.

A todos os colegas do Curso de Mestrado em Farmacologia, em especial à Profa. Tânia F. Saleh, pela amizade, carinho e apoio.

Aos colegas da iniciação científica.

À Prof. Dra. Marení R. Farias, pela amizade, carinho e apoio durante toda a minha formação profissional.

Aos meus familiares, em especial à querida tia Lídia, que com seu carinho e estímulo, ajudou a tornar esse trabalho uma realidade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>02</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1- Animais.....	23
3.2- Indução da pleurisia.....	23
3.3- Quantificação do exsudato.....	24
3.4- Contagem de Leucócitos.....	25
3.5- Dosagem de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) no exsudato.....	26
3.5.1-Desproteínização das amostras.....	26
3.5.2- Conversão de nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) para nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) nas amostras.....	27
3.5.3- Reação de Griess.....	27
3.6 - Protocolo experimental.....	28
3.6.1-Cinética celular induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK ou pela Lys-des-Arg <sup>9</sup> -BK na cavidade pleural de camundongos.....	28
3.6.2-Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	29

3.6.3-Efeito dos antagonistas seletivos do receptor $B_1$ , a des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-BK e a des-Arg <sup>9</sup> NPC 17731, e do receptor $B_2$ , o HOE 140, na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	30
3.6.4- Envolvimento de neuropeptídeos sensoriais na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	31
3.6.5- Possível envolvimento do óxido nítrico na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	32
3.6.6-Envolvimento dos produtos da ciclo-oxigenase na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK.....	33
3.6.7-Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK.....	34
4 - Drogas.....	35
5 - Análise Estatística.....	37
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1-Resposta inflamatória induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK ou pela Lys-des-Arg <sup>9</sup> -BK na cavidade pleural de camundongos.....	38

4.2-Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	42
4.3-Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B <sub>1</sub> , a des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-BK e a des-Arg <sup>9</sup> NPC 17731, e do receptor B <sub>2</sub> , o HOE 140, na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	43
4.4-Envolvimento de neuropeptídeos sensoriais na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	55
4.5-Envolvimento do óxido nítrico na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em camundongos.....	63
4.5.a-Efeito de inibidores da óxido nítrico sintase.....	63
4.5.b-Determinação dos níveis de nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) no extravasamento plasmático induzido pela des-Arg <sup>9</sup> -BK na cavidade pleural de camundongos.....	69
4.6-Envolvimento dos produtos da ciclo-oxigenase na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK.....	68
4.7-Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg <sup>9</sup> -BK.....	71

<b>5 -DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>96</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Perfil temporal da pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol /cav.) em camundongos.....40
- FIGURA 2** - Efeito de diferentes doses da des-Arg<sup>9</sup>-BK (10-100 nmol/ cav.) na cavidade pleural de camundongos.....41
- FIGURA 3** - Efeito da Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol/cav.) na cavidade pleural de camundongos.....44
- FIGURA 4a** - Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo de *E. coli* na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol/cav) em camundongos.....45
- FIGURA 4b** - Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo de *E. coli* no edema de pata induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (50 nmol/pata) em camundongos.....46
- FIGURA 5** - Efeito da des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....49

- FIGURA 6** - Efeito da des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 e 100 nmol/cav.), no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....50
- FIGURA 7** - Efeito da des-Arg<sup>9</sup>NPC 17731 (5 nmol/cav.), no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....52
- FIGURA 8** - Efeito do HOE 140 (30 nmol/cavidade), no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....53
- FIGURA 9** - Efeito do FK888 (1 nmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....57
- FIGURA 10** - Efeito do SR 48968 (20 nmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....58
- FIGURA 11** - Efeito do SR 142801 (10 nmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....59

- FIGURA 12** - Efeito do CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....60
- FIGURA 13** - Efeito da L-NOARG (1 pmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....64
- FIGURA 14** - Efeito da L-NAME (1 pmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....65
- FIGURA 15** - Efeito da D-NAME (1 pmol/cav.) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....66
- FIGURA 16** - Perfil temporal da dosagem de nitrato (NO<sub>3</sub>) presente no exsudato da cavidade pleural após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol/cav.) em camundongos.....70
- FIGURA 17** - Efeito da tratamento prévio com indometacina ( 1 mg.kg<sup>-1</sup> , i.p., 1 h antes) no exsudato e na migração de células inflamatórias

induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....72

**FIGURA 18** - Efeito da tratamento prévio com terfenadina ( 50 mg.kg<sup>-1</sup> , i.p., 30 antes) no exsudato e na migração de células inflamatórias induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.....73

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** - Efeitos da injeção i.t. de antagonistas seletivos para os subtipos de receptores  $B_1$  e  $B_2$  para as cininas analisados na cavidade pleural de camundongos, 1h e 4h após a injeção.....54
- Tabela 2** - Efeitos da injeção i.t. de antagonistas taquicinérgicos seletivos para os subtipos de receptores  $NK_1$ ,  $NK_2$  e  $NK_3$ , e para o CGRP na cavidade pleural de camundongos analisados 1h e 4h após a injeção.....62
- Tabela 3** - Efeitos da injeção i.t. dos inibidores da óxido nítrico sintase, analisados 1 h e 4 h após, na cavidade pleural de camundongos.....68

## 1.INTRODUÇÃO

A bradicinina (BK) é um potente peptídeo vasoativo formado endogenamente, e possui a seguinte sequência de aminoácidos (Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>) em sua estrutura. A BK é um nonapeptídeo que atua principalmente como hormônio local através de mecanismos autócrinos ou parácrinos. A capacidade da BK em induzir dor, inflamação e contração da musculatura lisa foi descrita pela primeira vez por Rocha e Silva et al. (1949), quando demonstraram o aparecimento da resposta contrátil no íleo isolado de cobaia. Esta resposta foi causada por uma substância liberada do sangue, quando tiras de íleo eram incubadas com tripsina ou com o veneno de algumas serpentes. A resposta contrátil desenvolvia-se lentamente quando comparada com aquela produzida pela histamina, não sendo antagonizada pela atropina. Na ocasião os autores concluíram que tratava-se de uma nova substância, e pelo fato de ser liberada lentamente eles a denominaram de *bradicinina*, (derivado do grego *bradys*= lento, e *kinein*=movimento).

A BK e demais cininas são formadas nos fluídos e tecidos biológicos a partir de proteínas precursoras, os cininogênios, que são  $\alpha$ -

globulinas de alto peso molecular (88 a 120 kD), ou de baixo peso molecular (50 a 68 kD), (Hall, 1992). Estas proteínas precursoras são sintetizadas pelo fígado, circulam na corrente sanguínea e são encontradas em secreções como a urina ou fluido nasal (Steranka et al., 1989). A quebra do cininogênio é feita por um grupo de enzimas proteolíticas, denominadas calicreínas, que estão presentes em muitos tecidos e fluidos corporais (Burch et al., 1990; Bhoola et al., 1992).

As calicreínas são enzimas serina-proteases, e são divididas em dois grupos: calicreína plasmática, que é sintetizada e secretada pelos hepatócitos para a circulação como molécula inativa, denominada de pré-calicreína; e a calicreína tecidual ou glandular, que é sintetizada pelas glândulas exócrinas (Bathon e Proud, 1991; Bhoola et al., 1992). Estas duas enzimas são codificadas por genes distintos, e diferem entre si com relação ao peso molecular, à composição de aa, ao tipo de cinina liberada, e à função desenvolvida (Carretero et al., 1993). A calicreína plasmática é codificada por um único gene (Seidah et al., 1989), enquanto que a calicreína tecidual é codificada por mais de um gene (Beaubien et al., 1991; Murray et al., 1990). A formação da BK no plasma humano é dependente da interação de três proteínas plasmáticas que possuem carga elétrica

negativa. Essas proteínas são o Fator XII (Fator de Hageman), a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular (Proud e Kaplan, 1988). Na corrente sanguínea, a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular circulam como um complexo estequiométrico de 1:1 molar o qual é inativo. Após a interação dessas proteínas inicia-se uma cascata de eventos bioquímicos: o fator de Hageman ativa a pré-caliceína (zimogênio), que é convertida em caliceína. Esta por sua vez hidrolisa o cininogênio de alto peso molecular formando o peptídeo vasoativo, a BK (Bhoola et al., 1992; Proud e Kaplan, 1988). A caliceína tecidual ou glandular foi originalmente isolada do pâncreas, sendo posteriormente isolada de outros órgãos exócrinos como as glândulas salivares e sudoríparas. Os genes para estas enzimas são expressos em diversas células epiteliais ou secretórias, incluindo a glândula salivar, o pâncreas, o intestino e o néfron distal, além de estar presente também em neutrófilos (Bhoola et al., 1992; Regoli e Barabé, 1980; Proud e Kaplan, 1988). Na maioria das espécies a caliceína tecidual cliva o cininogênio de baixo peso molecular formando a lisil-bradicinina, também denominada de calidina (Lys-BK). O peptídeo formado pode ser posteriormente clivado por aminopeptidases do plasma, que retiram o aminoácido Lys da porção

amino-terminal da molécula levando à formação de BK (Steranka et al., 1988). Entretanto, no rato e no camundongo, a calicreína tecidual converte o cininogênio de baixo peso molecular diretamente em BK (Bhoola et al., 1992).

A meia-vida plasmática das cininas é bastante pequena (15 a 30 segundos), sendo sua concentração nos fluídos biológicos também baixa (cerca de  $10^{-11}$  mol/l) (Sharma e Buchanan, 1994). Além disso, uma única passagem através da circulação pulmonar resulta em 80-90% de destruição desses peptídeos (Regoli e Barabé, 1980; ).

Quando produzidas, as cininas são rapidamente degradadas por peptidases denominadas genericamente de cininases. As cininases são encontradas no sangue, nas células endoteliais, e em outros tecidos (Campbell et al., 1993). Estas enzimas são denominadas de cininase I e cininase II. A cininase I é representada pelas carboxipeptidases M e N, as quais removem o aa Arg da porção C-terminal da molécula da BK, formando a des-Arg<sup>9</sup>-BK (no sangue) e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina (nos tecidos). A cininase II, uma dipeptidil carboxipeptidase, é também denominada de enzima conversora de angiotensina (ECA), e também remove os aminoácidos Phe-Arg da porção C-terminal (Bhoola et al., 1992). A ECA é

uma enzima que está localizada predominantemente na superfície luminal das células endoteliais, um fato que pode explicar a extensiva inativação pulmonar das cininas (Marceau et al., 1995). Embora não seja um fenômeno frequente, a cininase II eventualmente pode promover a clivagem da porção C-terminal da des-Arg<sup>9</sup>-BK, mas possui baixa afinidade pelos metabólitos da des-Arg<sup>9</sup> (Oshima et al., 1985). Outra enzima que também está presente no plasma, e que apresenta a mesma atividade da ECA sobre as cininas, é a endopeptidase neutra 24.11, conhecida também como encefalinase (Linz et al., 1995). A carboxipeptidase N, ou cininase I está presente no plasma em grandes quantidades, o que sugere uma atividade enzimática fisiologicamente importante para esta enzima (Erdös, 1979).

Uma vez formadas, as cininas BK e calidina são capazes de exercer vários efeitos biológicos participando da regulação do tônus da musculatura lisa vascular e não vascular, da pressão arterial, do transporte de glicose e de eletrólitos, bem como da estimulação da reabsorção óssea e da proliferação celular (Bhoola et al., 1992).

Com o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para as cininas, e com base em estudos envolvendo a relação entre a estrutura e a atividade biológica, bem como na relação de potência para vários análogos

das cininas, Regoli e Barabé (1980), classificaram os receptores para as cininas em dois grupos denominados de  $B_1$  e  $B_2$ . O receptor  $B_1$  é seletivamente sensível aos metabólitos da BK e da lisil-BK produzidos pela ação das carboxipeptidases M e N, a des-Arg<sup>9</sup>-BK e a lisil-des-Arg<sup>9</sup>-BK, respectivamente. Esses metabólitos têm seus efeitos antagonizados de forma competitiva e seletiva pelos antagonistas dos receptores  $B_1$  a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK ou a lisil-des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK. (Regoli & Barabé, 1980; Marceau, 1995; Bhoola et al., 1992; Farmer & Burch, 1992; Hall et al., 1992; Dray & Perkins, 1993). A des-Arg<sup>9</sup>-BK, formada por ação da cininase I, é um metabólito biologicamente ativo da BK e foi reconhecida como um produto endógeno formado na corrente sanguínea a partir dos estudos de Erdös e Sloane (1962), pois sua atividade biológica até esta época não tinha sido investigada. A partir daí, foi levantada a hipótese de que a des-Arg<sup>9</sup>-BK poderia participar de alguns processos fisiológicos ou patológicos (Hall, 1992) atuando como um ligante endógeno do receptor  $B_1$ , uma vez que a BK liga-se preferencialmente ao receptor  $B_2$ . Esta proposta foi sustentada por inúmeros experimentos, como por exemplo, na aorta isolada de coelho, onde a potência da bradicinina é considerada reduzida quando determinada na presença de um inibidor da cininase I, o

ácido DL-2-mercaptometil-3-guanidinoetilpropanóico (mergetpa), ao ser comparada com os tecidos não tratados, e sendo que a potência da des-Arg<sup>9</sup>-BK não foi alterada. Este fato sugeriu que a ação da BK sobre os receptores B<sub>1</sub> nesta preparação seria devido quase que inteiramente à conversão da BK em des-Arg<sup>9</sup>-BK como resultado da ação da carboxipeptidase durante a incubação do tecido (Hall, 1992).

Os receptores do subtipo B<sub>1</sub> foram inicialmente demonstrados em experimentos realizados com a musculatura lisa vascular de coelhos, após várias horas de incubação da preparação (Regoli et al., 1978). A resposta contrátil, mediada pelo receptor B<sub>1</sub> na aorta de coelho e em outros tecidos, foi abolida pelo tratamento prévio *in vitro* com o inibidor de síntese protéica, ciclohexemida, ou com o inibidor de síntese de RNA, a actnomicina D, bem como pelo brefeldin, um inibidor da translocação protéica (Bouthillier et al., 1987; deBlois et al., 1988, 1991). Essas observações indicam que na mediação da resposta ocorre a indução da expressão desses receptores (Audet et al., 1994). Uma densidade muito baixa desses receptores é encontrada em tecidos normais, sendo postulado que esse subtipo de receptor para as cininas está raramente presente em tecidos não lesados. A indução da expressão do receptor B<sub>1</sub> ocorre em

preparações como a musculatura lisa de coelhos, rato e porco (Marceau, 1995), e também em cólon humano (Couture et al., 1981) após algumas horas de incubação do tecido “*in vitro*”. Alguns experimentos “*in vitro*” com artéria mesentérica ou carótida de coelho também demonstram que a resposta relaxante à des-Arg<sup>9</sup>-BK se desenvolve de maneira tempo e síntese-protéica dependente (Marceau, 1995). Existem várias evidências de que o receptor B<sub>1</sub> pode ter uma participação relevante em certas condições patológicas como processos inflamatórios, onde participa do seu controle e modulação. Por outro lado, os receptores B<sub>2</sub> estão amplamente distribuídos no organismo, podendo ser localizados em tecidos de várias espécies animais tanto em nível central quanto periférico. Esses receptores são estimulados tanto pela BK como pela lisil-BK e estão presentes nos tecidos de forma constitutiva (Burch et al., 1990, 1993; Hall, 1992).

A expressão do receptor B<sub>1</sub> pode ser estimulada após uma infecção ou lesão tecidual, ou por uma variedade de tratamentos “*in vivo*”, incluindo tratamento com endotoxina, ou com citocinas como a IL-1 e IL-2 (deBlois et al., 1991), após a dessensibilização de receptores B<sub>2</sub>, ou ainda através de tratamento longo com *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin (BCG) (Davis & Perkins, 1994 a,b; Perkins & Kelly, 1993; Campos et al., 1995;

1996; 1997). A resposta à des-Arg<sup>9</sup>-BK também pode ser moderadamente aumentada pelo muramil dipeptídeo (Bouthillier et al., 1987; deBlois et al., 1989). O papel autócrino das citocinas, especialmente a IL-1, na indução da expressão dos receptores B<sub>1</sub>, é sustentado pela produção espontânea desta citocina em preparações como a musculatura lisa da aorta de coelhos após incubação em condições assépticas (Clinton et al., 1991). Nestas condições, a IL-1 é postulada como a principal responsável endógena pela indução destes receptores, além de ser o mediador que potencializaria os efeitos da des-Arg<sup>9</sup>-BK após a ativação do receptor no processo inflamatório (DeBlois e Marceau, 1987; Perkins e Kelly, 1993).

Ambos os subtipos de receptores para as cininas já foram clonados em uma variedade de espécies animais, sendo identificados como membros da família dos receptores ligados à proteína G, possuindo uma pequena homologia, aproximadamente 36 %, entre suas sequências de aminoácidos (McEachern et al., 1991; Hess et al., 1992; 1994; Menke et al., 1994; Ma et al., 1994; Pesquero et al., 1996).

Entretanto, comparado com os receptores B<sub>2</sub>, o subtipo de receptor B<sub>1</sub> para a BK não é tão conhecido. Sua relevância fisiológica ou patológica

e o seu papel no controle de processos inflamatórios ainda não estão completamente estabelecidos (Marceau e Regoli, 1991; Marceau, 1995).

Vários estudos demonstraram que a ativação de receptor  $B_1$  resulta na mobilização de  $Ca^{+2}$  intracelular como consequência da ativação da fosfolipase C pela proteína G (Issandou e Darbon, 1991; Tropea et al., 1993; Schneck et al., 1994).

A primeira demonstração de transcrição do mRNA para a codificação do receptor  $B_1$  foi obtida em sistema oócito de *Xenopus laevis*, onde a injeção do mRNA isolado de fibroblasto humano resultou na expressão de uma proteína com propriedades farmacológicas semelhantes ao receptor  $B_1$  (Phillips et al., 1992; Webb et al., 1994). O número de receptores foi bastante reduzido em comparação ao subtipo  $B_2$ , obtido na mesma célula e nas mesmas condições experimentais. Através de estudos funcionais farmacológicos tem sido sugerida a existência de duas formas de receptores  $B_1$ , uma constitutiva e outra induzida (Paiva et al., 1989; Wiemer E Wirth, 1992; Calixto e Medeiros 1992a).

As cininas atuam indiretamente através da liberação de outros mediadores endógenos, como o óxido nítrico (Moncada, 1989; Shelemper & Calixto, 1994; Hess, 1997), o fator agregador de plaquetas (PAF), as

prostaglandinas (Burch et al., 1990; Lerner et al., 1992), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) (Tiffany e Burch, 1989), histamina (Bueb et al., 1993), e outros mediadores derivados de neutrófilos, mastócitos, e macrófagos (Bathon e Proud, 1991; Cruwys et al., 1994). Além destes mediadores inflamatórios, as cininas também liberam neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) das fibras nervosas sensoriais (Geppetti., 1993).

A BK quando adicionada aos tecidos mimetiza vários eventos característicos da inflamação como a vasodilatação e a dor (Elliot et al., 1960), bem como migração de células inflamatórias (Saleh et a.l., 1997). Existem dados na literatura que demonstram a participação das cininas no processo de inflamação neurogênica que ocorre em diversas doenças do trato respiratório como a asma , a bronquite e a rinite (Geppeti et al., 1995; Shelhamer et al., 1995). As fibras nervosas sensoriais são estimuladas por vários agentes específicos e não específicos, incluindo as cininas. Essas por sua vez liberam entre outros mediadores as taquicininas, o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Esses peptídeos, por sua vez, contribuem para a amplificação do processo inflamatório (Geppetti et al., 1993; Geppetti et al., 1995). Existem

muitas evidências demonstrando que os neuropeptídeos uma vez liberados na periferia podem modular a resposta inflamatória em uma variedade de situações, estando também presentes na patogênese da asma (Geppetti et al., 1995; Advenier et al., 1997).

De forma semelhante às aminas biologicamente ativas, as taquicininas são sintetizadas a partir de proteínas precursoras por simples descarboxilação. Os neuropeptídeos são codificados de seus genes respectivos e são obtidos através de uma complexa via de biossíntese (Regoli et al., 1994). De forma semelhante a outros peptídeos, as taquicininas exercem numerosas ações "*in vivo*", sendo a maioria delas distintamente mediadas por três subtipos de receptores: NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>. Os receptores taquicinérgicos são componentes essenciais da membrana das células-alvo, que vão mediar os efeitos biológicos das taquicininas. Estudos com receptores taquicinérgicos de rato e humano revelaram que estes possuem estrutura semelhante à rodopsina, sendo compostos também por sete domínios transmembrana conectados por alças intra e extra celulares. Estes receptores mostram grande similaridade com vários outros receptores ligados à proteína G (Probst et al., 1992; Gerard et al., 1993). A estimulação elétrica ou com irritantes químicos das fibras nervosas

sensoriais, causam extravasamento plasmático e vasodilatação com consequente formação de edema (Jancsó et al., 1977), sendo esses efeitos mediados pela liberação de neuropeptídeos como a SP e o CGRP. Esses dois agentes podem atuar sinergisticamente na produção do edema, exacerbando desta forma a resposta com relação ao efeito causado por um neuropeptídeo isoladamente (Brain e Williams, 1985). É descrito na literatura que a SP e o CGRP estão co-localizados nas fibras nervosas sensoriais (Lundberg et al., 1985; Maggi, 1995).

A SP é um potente ativador de mastócitos e é capaz de aumentar a permeabilidade microvascular diretamente pela ativação dos receptores  $NK_1$  (Regoli et al., 1994). Além disso, este neuropeptídeo também é capaz de ativar a expressão do gene para o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e de promover a degranulação de mastócitos e a liberação de TNF- $\alpha$  (Lowman et al., 1988). Por outro lado, o neuropeptídeo CGRP é um potente vasodilatador que através da ativação de receptores  $CGRP_1$  é capaz de causar prolongada vasodilatação (Brain e Williams, 1985; Escott e Brain, 1993).

A SP e as taquicininas relacionadas são potentes estimulantes da musculatura lisa intestinal, das vias aéreas, do sistema urinário, do útero,

como também de outros órgãos. Pela indução da contração da musculatura lisa destes órgãos, estes peptídeos exercem uma variedade de efeitos periféricos, tais como a ativação da motilidade intestinal, broncoconstrição, contração da bexiga urinária, do ureter, da uretra, do útero, e de outros órgãos (Maggi et al., 1993; Maggi, 1995 ). Esta contração da musculatura lisa é mediada através da ativação dos três receptores para as taquicinininas, sendo um processo semelhante ao de outros peptídeos, mostrando depender da produção de  $IP_3$  e  $Ca^{2+}$  (Regoli et al., 1994; Guard e Watson, 1991).

Os antagonistas taquicinérgicos do receptor  $NK_1$  têm sido descritos na literatura como inibidores da inflamação neurogênica (Lembeck et al., 1992; Moussaoui et al., 1994; Shirasaki et al., 1997). Além disso, estes agentes também são descritos como inibidores da adesão de neutrófilos e de eosinófilos, bem como do extravasamento plasmático induzido pela SP em traquéia de rato (Baluk et al., 1995). A SP é também capaz de induzir o influxo de células polimorfonucleares na pele de camundongo e do homem (Matsuda et al., 1989; Smith et al., 1993). Já foi demonstrado, que a migração de leucócitos em resposta à SP parece ser dependente da ativação de mastócitos (Kowalski et al., 1990), uma vez que este efeito não é observado em camundongos deficientes destas células (Yano et al., 1989).

É descrito, que o TNF- $\alpha$  liberado pela SP media a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais das vênulas, e em neutrófilos (Ansel et al., 1993).

O óxido nítrico (NO $\cdot$ ), atualmente conhecido como um mediador liberado de neurônio não adrenérgico-não colinérgico (NANC), foi identificado com o fator de relaxamento dependente do endotélio. Este radical livre é um estimulador endógeno da guanilato ciclase solúvel (Furchgott, 1988). O NO $\cdot$  é sintetizado a partir da L-arginina por ação de uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), e participa de várias funções fisiológicas. A formação do NO $\cdot$  nas células endoteliais vasculares se dá a partir de um estímulo, e é capaz de manter o tônus vasodilatador que é essencial para a regulação do fluxo e da pressão sanguínea (Moncada et al., 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990). O NO $\cdot$  uma vez produzido pelo endotélio ou pelas plaquetas é capaz de inibir a agregação plaquetária e a adesão destas e de leucócitos ao endotélio, bem como modular a proliferação celular da musculatura lisa (Moncada e Higgs, 1993). Os neurônios não-adrenérgicos, não-colinérgicos participam de algumas formas de vasodilatação neurogênica, e regulam certas funções como gastrointestinal, respiratória e geniturinária (Rand, 1992; Toda,

1995). Estas ações fisiológicas exercidas pelo  $\text{NO}\cdot$  são mediadas por ativação da guanilato ciclase e conseqüente aumento da concentração de guanosina monofostato cíclico (GMPc) nas células alvo (Murad et al., 1990; Ignarro, 1991). A óxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima que possui um grupamento heme na sua sequência, à semelhança da citocromo P450-redutase. Três isoformas da NOS são conhecidas, duas das quais são formas constitutivas expressas no endotélio, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e no tecido neural, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Estas isoformas estão presentes no citosol, e sua resposta é regulada pelas concentrações do  $\text{Ca}^{+2}$  e da calmodulina (Forstermann et al., 1991). Este tipo de NOS libera o  $\text{NO}\cdot$  em pequenas quantidades, na ordem de picomol em resposta a ativação, seja de receptores das cininas ou das taquicininas, ou também por estimulação física. O  $\text{NO}\cdot$  liberado por esta enzima atua no mecanismo de transdução de várias respostas fisiológicas.

A terceira isoforma da enzima tem sua expressão induzida (iNOS) por estímulos imunológicos ou inflamatórios, ou por citocinas pró-inflamatórias após ativação de macrófagos, de células endoteliais e também por outras células. Estas citocinas são o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o

fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ou este estímulo pode ser exercido pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *E.coli*, (Deng et al., 1993; Palmer et al., 1993; Damoulis et al., 1994).

Uma vez expressa, esta enzima libera quantidades de NO $\cdot$  na ordem de nanomol. A NOS induzida é citosólica, e sua atividade é independente de Ca<sup>+2</sup>, porém requer a presença de tetrahydrobiopterina e de outros cofatores para ser ativada. A distribuição destas três isoformas nos tecidos é variável, uma vez que a isoforma eNOS não está somente presente nas células endoteliais vasculares, mas também nas plaquetas (Radomski et al., 1990), e em determinadas populações de neurônios no cérebro (Dinerman et al., 1994). Por outro lado, a nNOS está presente também no epitélio dos brônquios e da traquéia (Kobzik et al., 1993), e na musculatura esquelética (Kobzik et al., 1994). Já foram também identificadas algumas diferenças entre a iNOS obtida de diferentes tecidos dentro de uma mesma espécie (Mohaupt et al., 1994). De forma surpreendente, foi detectado que a eNOS, que normalmente se encontra na isoforma constitutiva, pode ser induzida em determinadas situações, como por exemplo no exercício crônico (Sessa et al., 1994) ou mesmo durante a gestação, ocasião na qual ambas as enzimas eNOS e iNOS são induzidas (Weiner et al., 1994). Da mesma

maneira, a iNOS parece estar presente constitutivamente em alguns tecidos, incluindo o epitélio brônquico (Kobzik et al., 1993), rim de rato (Mohaupt et al., 1994), e alguns tecidos no feto (Baylis et al., 1994).

Este radical livre pode ser liberado por macrófagos murinos, como também por outras células após ativação do sistema imunológico (Moncada et al., 1991; Lyons et al., 1995). A IL-1 $\beta$  estimula a indução da síntese de NOS nas células da musculatura lisa vascular, onde esta enzima não está usualmente presente (Beasley et al., 1991; Takizawa et al., 1997). Quando os níveis de NO $\cdot$  aumentam na célula da musculatura lisa vascular, a guanilato ciclase é ativada e sintetiza o GMP cíclico, e este por sua vez vai estimular o relaxamento da musculatura. Deste modo, a liberação de NO $\cdot$  através da iNOS exerce, além de outros efeitos biológicos, a vasodilatação patológica e lesão tecidual (ver: Moncada et al., 1991). Já foi demonstrado, que o NO $\cdot$  atua também como uma molécula citotóxica para uma variedade de patógenos incluindo bactérias, parasitas, fungos e helmintos (Hibbs et al., 1990; Nathan, 1992; Fernandes et al., 1997), como também para células tumorais (Marangos et al., 1993). O NO $\cdot$  é uma molécula bastante reativa e interage com vários alvos dentro da célula, incluindo guanilato ciclase, ciclooxigenases, ribonucleotídeo redutase, fosfolipídeos de membrana, e

DNA (Nathan, 1992). O  $\text{NO}\cdot$  pode também reagir com radicais derivados do oxigênio como o superóxido, e produzir substâncias tóxicas como o peroxinitrito (Beckman et al., 1990; Hibbs, 1992). O peroxinitrito é um potente agente oxidante, porém parece que mecanismos efetivos são capazes de remover e inativar sua ação tóxica (Moro et al., 1994).

Muitas evidências mostram a participação do  $\text{NO}\cdot$  na regulação das funções das vias aéreas em mamíferos. Assim, o  $\text{NO}\cdot$  participa na defesa imunológica e está envolvido na patogênese do choque séptico, na inibição de plaquetas, na neurotransmissão e no processo inflamatório (Moncada e Higgs, 1993). Os efeitos do  $\text{NO}\cdot$  na musculatura lisa, nos neutrófilos, linfócitos, e quando sintetizado no epitélio das vias aéreas, podem ter uma participação importante na regulação da reatividade do trato respiratório, particularmente em associação com doenças inflamatórias das vias aéreas, como por exemplo a asma (Watkins et al., 1997).

Muitas populações de receptores podem ter suas expressões reguladas, sendo o receptor  $\text{B}_1$  um exemplo de receptor pertencente à família de receptores ligados à proteína G e que pode ser induzido. Várias situações como a incubação do tecido *in vitro* por longo período, a injeção de LPS *in vivo*, entre outras já comentados anteriormente, são capazes de

aumentar a expressão desses receptores nos tecidos de várias espécies. Entretanto, a importância dos efeitos mediados pelo receptor  $B_1$  em condições fisiológicas é pouco conhecida. A expressão desses receptores também foi detectada em fibroblastos, macrófagos e células da musculatura lisa, entre outros, e em estados patológicos, notadamente em processo inflamatório (Chabine et al., 1993, Perkins e Kelly, 1993; Marceau, 1995). No entanto, a presença de receptores  $B_1$  constitutivos em alguns tecidos como no ducto deferente de camundongo (Maas et al, 1995), ou nas fibras nervosas sensorias (Mantione et al., 1995) em camundongos, já foi caracterizado. O aparecimento tardio deste receptor nos tecidos em processos inflamatórios pode ser também explicado pelo fato de que o receptor  $B_1$  pode sofrer menor dessensibilização do que o receptor  $B_2$ . É possível a coexistência de receptores do subtipo  $B_1$  (constitutivo) e  $B_2$  para as cininas na mesma preparação como por exemplo no duodeno (Boschov et al., 1984), cólon (Rangachari et al., 1993) e rins (Lortie et al., 1992) de cães e tipos celulares como células endoteliais bovinas (D'Orléans-Juste et al., 1989, Wiemer e Wirth, 1992) e fibroblastos de pulmão humano (Goldstein e Wall, 1984). Deste modo, estudos em modelos experimentais com a presença de uma única população constitutiva do receptor  $B_1$ , como

por exemplo na cavidade pleural de camundongo, se faz interessante, e pode contribuir para esclarecer o real papel do receptor  $B_1$  nos processos fisiopatológicos.

## 2.OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido visando atingir os seguintes objetivos:

1. Procurar caracterizar, com o auxílio de agonistas e antagonistas seletivos, o subtipo de receptor, bem como o perfil temporal da resposta inflamatória causada pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

2. Investigar a participação de outros mediadores químicos na resposta inflamatória causada pela des-Arg<sup>9</sup>-BK no modelo murino de pleurisia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos suíços albinos (pesando entre 20-25 g) fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da UFSC em ambiente com temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas, com acesso à alimentação e água *ad libitum*.

#### 3.2. Indução da pleurisia

Para indução da pleurisia os animais receberam injeção intratorácica (i.t.) de 100 µl de salina estéril contendo des-Arg<sup>9</sup>-BK (10-100 nmol por cavidade) através da introdução de uma agulha 13x5 no espaço intercostal, no lado direito da cavidade torácica dos animais de acordo com a técnica previamente descrita por Spector et. al, (1956), e adaptada para camundongos por Henriques et al., (1991). Os animais do grupo controle receberam uma injeção i.t. de 100 µl de salina estéril.

### 3.3. Quantificação do exsudato

Para determinar a quantidade do extravasamento plasmático induzido pela injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, os animais receberam injeção intravenosa com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.) 24 h antes da injeção intratorácica do agonista. Após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, os animais foram sacrificados em vários intervalos de tempo (5 min a 72 h) por inalação de éter etílico. Em seguida, os animais tiveram a cavidade torácica aberta através de uma incisão ventral longitudinal mediana. A seguir, o apêndice xifóide foi pinçado e feita a abertura da cavidade pleural por uma incisão no diafragma. Posteriormente, a cavidade pleural dos animais foi lavada com 1 ml de solução tampão de fosfato (PBS - pH 7.4) contendo: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e fosfato 10 mM associado com heparina (20 UI por ml). O volume foi coletado com uma pipeta automática e as células foram removidas por centrifugação à 1500 g , por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram estocados 500 µl do sobrenadante de cada amostra em freezer (-20°C) para a posterior determinação da concentração de azul de Evans. No dia da realização da análise, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e o azul de Evans foi quantificado através de espectrofotômetro (Hitachi U-2001) à

600 nm. Para quantificar o azul de Evans contido nas amostras, suas densidades ópticas foram comparadas às de uma curva-padrão de azul de Evans com concentrações conhecidas e crescentes variando entre 0,5 a 10 µg/ml. Através de regressão linear foi obtida uma equação da reta definida pelas densidades ópticas da curva-padrão, e todos os valores de absorvância medidos das amostras foram submetidos à esta equação.

#### 3.4. Contagem de leucócitos

A contagem do número total de células presente no exsudato foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 400 vezes) com 10 µl da amostra do exsudato diluídos em 200 µl de líquido de Turk (1:20). A contagem diferencial das células foi feita através da confecção de lâminas com amostras do exsudato em citocentrífuga (Cytospin 3). Após, as lâminas foram coradas com corante (Panótico), e posteriormente analisadas em microscópio óptico sob objetiva de imersão. Foi realizada a contagem de trezentas células aproximadamente por lâmina, e os resultados foram expressos pelo número de cada população de células por ml de exsudato.

### 3.5. Dosagem de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) no exsudato pleural

#### 3.5.1. Desproteínização da amostra

A lavagem da cavidade pleural de diferentes grupos de animais foi realizada nos 5, 15, 30, 60 ou 240 min após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), e a partir do exsudato coletado foi feita a dosagem de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ).

A determinação da formação do  $\text{NO}\cdot$  foi feita de forma indireta através da quantificação dos níveis de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) no exsudato. Desta forma, foram utilizados 500  $\mu\text{l}$  de exsudato pleural e colocados em tubos Eppendorffs de 1 ml. A cada amostra foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , 10% (p/v) em água, homogeneizados e deixados em repouso durante 10 minutos a 4 °C. Decorrido este período, foram adicionados 10  $\mu\text{l}$  de NaOH (2.5 N), e deixados em repouso por mais 10 minutos a 4 °C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos para a realização da reação de conversão de nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) para nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ).

### 3.5.2. Conversão de nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) para nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) nas amostras

Para realizar a conversão de nitrato ( $\text{NO}_2^-$ ) para nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) foram colocados em tubos Eppendorff: 300  $\mu\text{l}$  da amostra, juntamente com 30  $\mu\text{l}$  de fosfato de sódio ( 0,5 M, pH: 7.2), 30  $\mu\text{l}$  de formato de amônio (2,4 M, pH: 7,2) , e 30  $\mu\text{l}$  de *Escherichia coli* diluída em água miliQ (1:10).

Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-Maria à 37°C durante 2 horas, e em seguida foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos a 20°C. Foram recuperados 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante para a realização da Reação de Griess.

### 3.5.3. Reação de Griess

Para realizar a Reação de Griess (Bartholomew, 1984), foram utilizados 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante das amostras após centrifugação, e misturados com igual volume do reagente de Griess . O reagente de Griess consiste na mistura de partes iguais de sulfanilamida 1% (p/v) em 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (v/v), e  $\alpha$ -[naftil] etileno diamina clorodihidro à 0,1% em  $\text{H}_2\text{O}$ . Em seguida foram feitas as medidas de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Hitachi-U-2001). Utilizando concentrações conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  (1-50  $\mu\text{M}$ ), foi construída a curva-padrão. Através de regressão

linear, foi definida uma equação da reta com os valores das densidades ópticas da curva-padrão, a partir da qual todas as densidades ópticas medidas das amostras foram submetidas para quantificar o nitrato presente no exsudato.

### 3.6. Protocolo experimental

#### 3.6.1. Cinética celular induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK ou pela Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos

Para analisar o possível efeito inflamatório do metabólito ativo da bradicinina, a des-Arg<sup>9</sup>-BK, nas vias aéreas de camundongos, foi realizada a administração de injeção intratorácica do peptídeo (30 nmol por cavidade). Após a administração intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, vários grupos de animais foram sacrificados em períodos diferentes de tempo (5 min a 72 h) para análise do exsudato e da migração de células inflamatórias para a cavidade pleural destes animais. Deste modo, foi feita uma análise temporal do exsudato e do influxo de células para a cavidade pleural dos animais, sendo identificado um pico do extravasamento plasmático (1 h) após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade). A

cinética celular induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural dos animais apresentou um pico (4 h) seguido da injeção intratorácica com influxo de neutrófilos, e outro pico de células mononucleares após 12 horas da injeção intratorácica do agonista. Após análise temporal da resposta biológica da des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural dos animais, foi realizada uma curva dose-resposta para este agonista (10 a 100 nmol por cavidade).

Com o objetivo de comparar a potência dos agonistas seletivos de receptores B<sub>1</sub> na cavidade torácica de camundongos foi utilizado outro agonista, a Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), sendo os mesmos parâmetros analisados nos picos de 1 h e de 4 h.

### 3.6.2. Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos

Para verificar uma possível indução dos receptores B<sub>1</sub> para as cininas na cavidade pleural de camundongos outro grupo de animais recebeu tratamento prévio de 10 µg por animal de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6), administrado intravenosamente (i.v.) 24 horas antes da indução do processo inflamatório conforme descrito por Regoli et al., (1980), Cabrini et al., (1996) e Campos et al., (1996). 24 h

após os animais receberam uma injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) e os parâmetros analisados foram o pico de extravasamento plasmático em 1 h, e a migração de células inflamatórias com pico em 4 h, na cavidade pleural dos animais.

### 3.6.3. Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos

Visando caracterizar a participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas na resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), foram realizados outros experimentos utilizando-se os antagonistas seletivos para o receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 e 100 nmol por cavidade) e des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (5 nmol por cavidade) ou B<sub>2</sub> Hoe 140. Os antagonistas foram administrados em associação com a des-Arg<sup>9</sup>-BK para avaliar a participação destes receptores no extravasamento plasmático. Para avaliar o envolvimento destes receptores na migração de neutrófilos, os antagonistas foram administrados através de injeção intratorácica, 30 e 60 minutos antes do pico da migração de neutrófilos (4 h).

### 3.6.4. Envolvimento de neuropeptídeos sensoriais na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos

Com o objetivo de analisar o possível envolvimento das fibras nervosas sensoriais do tipo C na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK, outros grupos de animais receberam injeção intratorácica dos antagonistas taucinérgicos NK<sub>1</sub>, FK 888 (1 nmol por cavidade), NK<sub>2</sub>, SR 48968 (20 nmol por cavidade) ou NK<sub>3</sub>, SR 142801 (10 nmol por cavidade), 5 minutos antes da indução da pleurisia (Saleh, 1997). A seguir, os animais receberam injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), e foram analisados o pico de extravasamento plasmático em 1 h, e o pico da migração de neutrófilos em 4 h.

Para avaliar a participação de outro neuropeptídeo, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) na resposta induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) em camundongos, os animais receberam injeção i.t. do antagonista deste receptor o CGRP<sub>8-37</sub> administrado 5 minutos antes da indução do pleurisia pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os parâmetros analisados foram o pico do extravasamento plasmático em 1 h e o pico da migração de neutrófilos em 4 h.

### 3.6.5. Possível envolvimento do óxido nítrico na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos.

Com o objetivo de analisar o envolvimento do óxido nítrico na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos, foram utilizados dois protocolos distintos de manipulação: em um grupo de animais foi feito tratamento prévio com inibidores das óxido nítrico sintases, e em outro grupo de animais foi feita a dosagem dos níveis de nitrito (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no exsudato coletado da cavidade pleural dos animais após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.).

Primeiramente, foram utilizados dois inibidores da enzima óxido nítrico sintase, a N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina; (L-NOARG), e a (N (w)-nitro-L-arginina metil éster; (L-NAME). Essas drogas foram administradas através da injeção intratorácica (1 pmol por cavidade), 30 minutos antes da indução da pleurisia (Saleh, 1996). Os parâmetros foram avaliados 1 h e 4 h após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Outro grupo de animais recebeu injeção intratorácica do D-enantiômero, D-NAME (N-(w)-nitro-D-arginina metil ester), um isômero inativo da L-NAME, na dose de (1 pmol por cavidade) administrado 30

minutos antes da indução da pleurisia com a des-Arg<sup>9</sup>-BK. A dosagem de nitrito (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no exsudato pleural coletado nos 5, 15, 30, 60 ou 240 min após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos foi realizada através de Reação de Griess, conforme ensaio bioquímico anteriormente descrito.

### 3.6.6. Envolvimento dos produtos da ciclo-oxigenase na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK

Para analisar a participação dos produtos da ciclo-oxigenase no extravasamento plasmático e na migração de células inflamatórias para a cavidade pleural dos animais após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), os animais foram tratados por via intraperitonal com indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases, na dose de 1 mg kg<sup>-1</sup>. A injeção de indometacina foi feita uma hora antes da injeção intratorácica da des-Arg<sup>9</sup>-BK para analisar o seu efeito sobre os dois parâmetros estudados.

### 3.6.7. Envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK

O possível envolvimento da histamina na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK foi avaliado através da administração de terfenadina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), um antagonista do receptor H<sub>1</sub> da histamina, por via intraperitoneal, 30 minutos antes da indução da pleurisia. Os parâmetros estudados foram: o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais, 1 h e 4 h após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, respectivamente.

#### 4. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas no desenvolvimento deste trabalho: (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina) L-NOARG, (N(w)-nitro-L-arginina metil ester) L-NAME, (N-(w)-nitro-D-arginina metil ester), D-NAME, indometacina, CGRP8-37, azul de Evans, terfenadina e lipopolissacarídeo (*Escherichia coli* sorotipo 026:B6), todas provenientes da Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A., heparina (Liquemine<sup>®</sup>, Roche, Brazil), panótico (Labormed, Brazil), des-Arg<sup>9</sup>-BK, Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK e des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (Península Belmont, CA, U.S.A.); HOE 140 (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,D-Tic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-BK) e des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ser-D-Hyp-(transpropil)-Oic), foram fornecidos pelo Departamento de Síntese Farmacêutica da Hoechst (Frankfurt, Alemanha) e pela SCIOS/NOVA, (Baltimore, U.S.A.), respectivamente; FK 888 ({94R)-4-hidroxi-1-([1-metil-1h-indol-3-il]carbonil)-L-N-benzil-N-metil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamida} foi fornecido pela Fujisawa Pharmaceutical CO, Osaka, Japan; SR 48968 ((s)-N-metil-N-[4-acetilamino-4-fenilpiperidino-2-(3,4 diclorofenil)butil]benzamida}) e SR 142801 [(s) - (N)-(1-(3-(1-benzoil-3-(3,4-dicloro-fenil) piperidin-3-il) propil)-4-fenilpiperidin-4-il)-N-metilacetamida] foram fornecidos pela Sanofi

Recherche, Montpellier, França. As soluções-estoque de todos os peptídeos foram preparadas com PBS (1-10 mM), com exceção dos antagonistas taquicinérgicos FK 888, SR 48968 e SR 142801 que foram previamente dissolvidos em etanol absoluto e estocados em tubos de Eppendorffes de polietileno siliconizados. A indometacina foi dissolvida em solução de 5% de NaHCO<sub>3</sub>. Todas as drogas foram mantidas a -18 °C e diluídas poucos minutos antes do uso de acordo com a concentração definida para o experimento a ser realizado. As outras drogas utilizadas neste trabalho foram preparadas diariamente com solução salina estéril (NaCl 0.9%). A concentração final da solução de etanol para dissolver os antagonistas taquicinérgicos foi menor do que 5 %, com o objetivo de evitar um efeito “*per se*” do etanol, ou para não afetar a ação da des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural dos animais. Os reagentes utilizados no ensaio bioquímico foram os seguintes: ZnSO<sub>4</sub> 10% (p/v), NaOH (2.5 N), fosfato de sódio ( 0.5 M, pH: 7.2, sulfanilamida 1% (p/v) em 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v), e N-[naftil] etileno diamina clorodihidro 0.1% em H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> (Merck), formato de amônio (2.4 M, pH: 7.2) (Riedel-de Haën). A *Escherichia coli*, fonte de nitrato reductase utilizada no ensaio bioquímico, foi preparada em nosso laboratório de bioquímica e mantida a (-70 °C).

## 5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças entre os grupos foram determinadas utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) e complementados pelo teste de Dunnett ou pelo teste “t” não-pareado quando necessário. Os valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ), foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ações inflamatórias da des-Arg<sup>9</sup>-BK e da Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

Os resultados apresentados na figura-1 mostram que a injeção intratorácica (i.t.) do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> para as cininas, a des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), foi capaz de causar extravasamento plasmático e infiltração de células inflamatórias para a cavidade pleural de camundongos de maneira tempo-dependente. Estes dois parâmetros desenvolveram-se em diferentes períodos de tempo, sendo que o extravasamento plasmático induzido pela administração de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos foi evidente já a partir de 5 minutos após a injeção intratorácica do agonista. Este efeito manteve-se em ascensão 15 e 30 minutos após a injeção do peptídeo, alcançando o pico máximo 1 hora após a indução da pleurisia (P<0.05). O extravasamento plasmático retornou ao valor basal 2 horas após a injeção intratorácica do agonista, enquanto a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para a cavidade pleural dos animais, foi evidente a partir da primeira hora após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Este efeito atingiu um pico máximo quatro horas após a indução da pleurisia (P<0.01). O influxo de

leucócitos decresceu subitamente seis horas após a indução da pleurisia, mantendo-se ainda com valores significativamente elevados em relação aos valores do grupo controle 24 horas depois da injeção intratorácica do agonista ( $P < 0.01$ ). Além disso, 12 horas após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK ocorreu um influxo maior de células mononucleares de maneira significativa, sendo este efeito que mantido por mais de 12 horas. Contudo, 48 horas, e até 72 horas após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, as células polimorfonucleares e mononucleares retornaram aos valores basais.

A figura-2 B e C mostra que a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 e 100 nmol por cavidade) aumentou de maneira significativa e dose-dependente o número de células mononucleares e de polimorfonucleares na cavidade pleural dos animais. A figura 2-A mostra que a des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 e 100 nmol por cavidade) também aumentou significativamente o extravasamento plasmático, embora este efeito não tenha ocorrido de maneira dose-dependente. Assim, enquanto a exsudação foi máxima com 30 nmol de des-Arg<sup>9</sup>-BK por cavidade, a migração de células mononucleares e de neutrófilos no pico de 4 h foi máxima com 100 nmol por cavidade desse peptídeo.

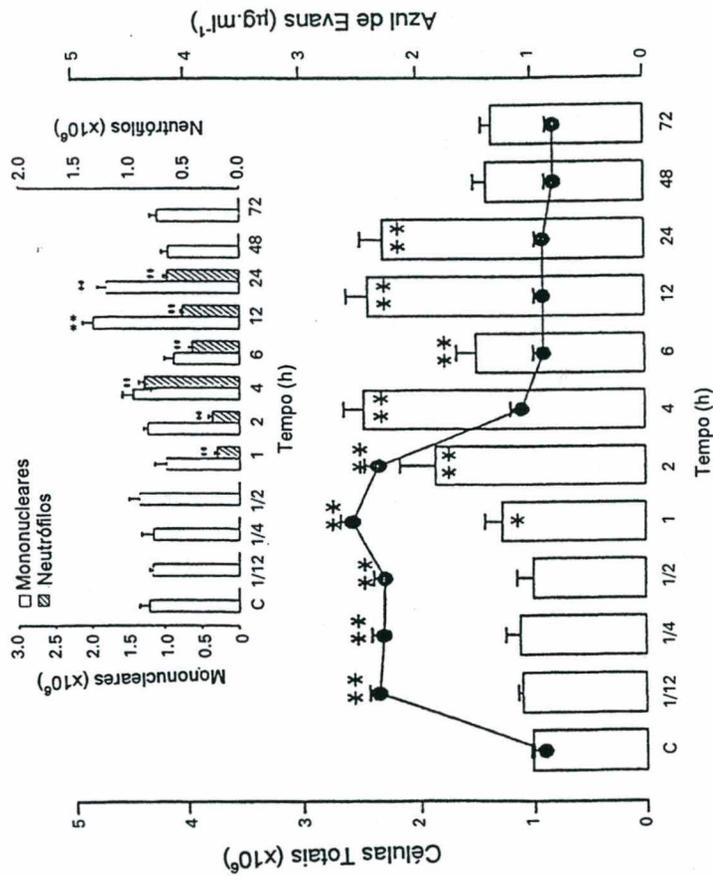


Figura 1- Perfil temporal da pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos. Grupo controle (C) obtido com animais tratados com injeção i.t. de salina estéril. Os asteriscos inseridos dentro e fora das colunas indicam os níveis de significância entre o número de células totais (colunas), e os valores do exsudato (círculo fechado), em relação aos respectivos grupos controle (C). A figura inserida mostra a variação temporal de ambas as células mononucleares (coluna aberta) e neutrófilos (coluna hachurada), na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos dentro e fora das colunas indicam os níveis de significância de ambos neutrófilos e mononucleares em comparação aos respectivos grupos controles. Cada coluna ou círculo representa a média de 10 animais com o e.p.m.. Em alguns grupos, os valores de e.p.m. se sobrepueram aos símbolos. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

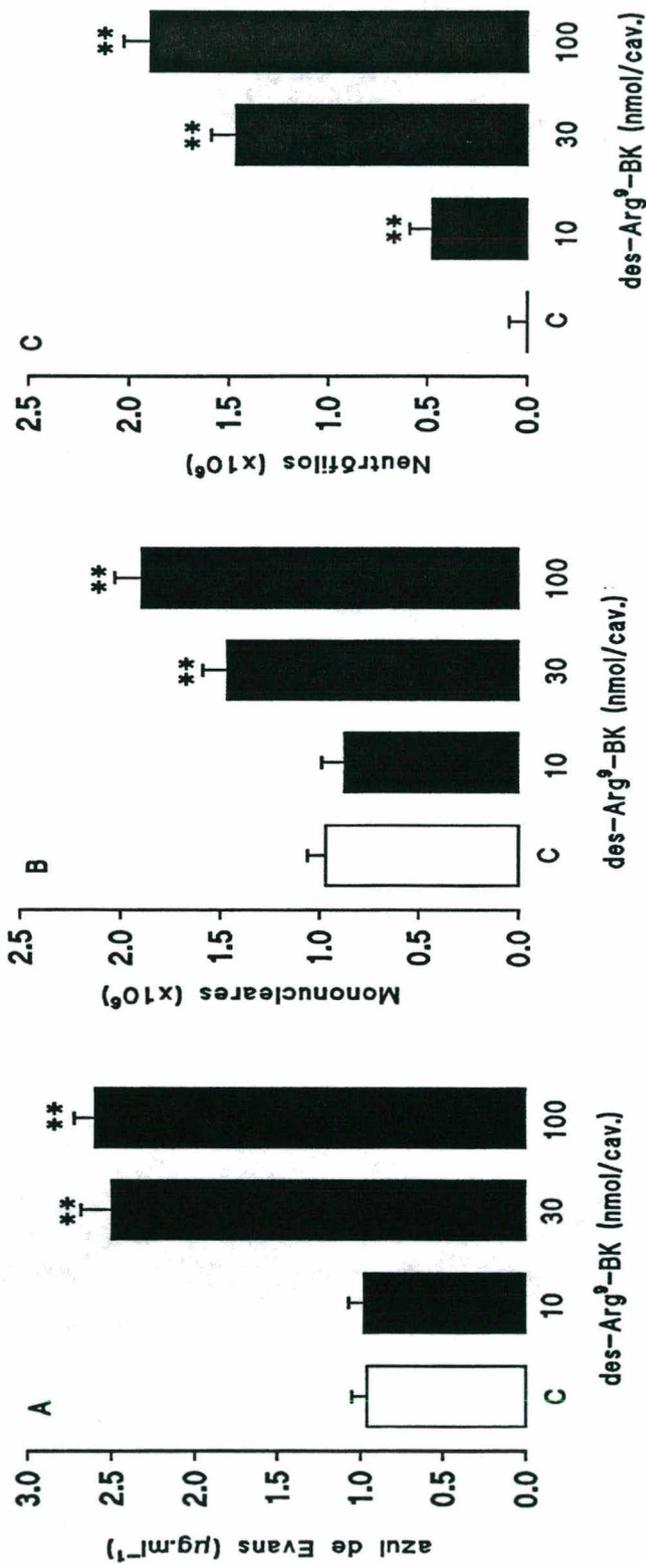


Figura 2- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (10 a 100 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos. O grupo de animais controle (C, coluna aberta) recebeu injeção i.t. de salina estéril. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

Os resultados da figura-3 mostram a resposta inflamatória induzida por outro agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub>, a Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) na cavidade pleural de camundongos. Este agonista também causou aumento do extravasamento plasmático medido no pico de 1 h e da infiltração de células polimorfonucleares medida no pico de 4 h. As ações inflamatórias causadas pela Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK considerando ambos os parâmetros analisados não foram significativamente diferentes quando comparadas à resposta inflamatória induzida pela injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK.

#### 4.2. Efeito do tratamento prévio com lipopolissacarídeo da *Escherichia coli* na pleurisia e no edema de pata induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos.

O tratamento prévio dos animais com injeção intravenosa de 10 µg por animal de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) 24 horas antes da injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK não foi capaz de modificar significativamente o extravasamento plasmático quando analisado no pico de 1 h e comparado com os animais tratados com salina. Este tratamento também não foi capaz de alterar a cinética celular analisada no pico de 4 h

após a indução do processo inflamatório com o agonista seletivo para o receptor  $B_1$  para as cininas, (figura-4a). Entretanto, o mesmo tratamento induziu aumento do edema de pata causado pela injeção de des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos, (figura-4b).

#### 4.3. Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores $B_1$ e $B_2$ na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos.

Os resultados apresentados na figura-5 mostram o efeito do antagonista seletivo para o receptor  $B_1$  para as cininas, a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK na dose de (60 nmol por cavidade) sobre o extravasamento plasmático e sobre a migração de neutrófilos induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Quando a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cavidade) foi administrada juntamente com o agonista seletivo para o receptor  $B_1$ , a des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), foi possível verificar uma diminuição significativa no extravasamento plasmático analisado 1 h após a indução da pleurisia. O número de células mononucleares foi significativamente diminuído quando

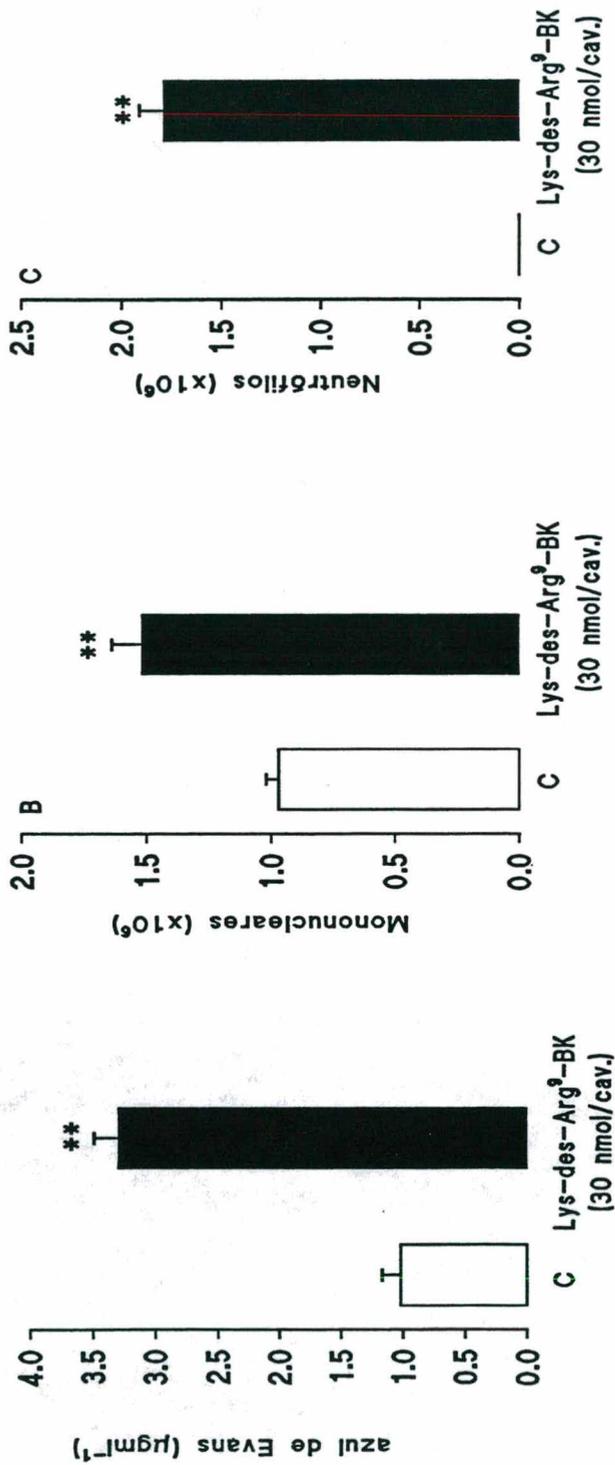


Figura 3- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzida pela injeção i.t. de Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos. O grupo de animais controle (C, coluna aberta) recebeu injeção i.t. de salina estéril. Os asteriscos sobre cada coluna indicam a diferença estatística em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

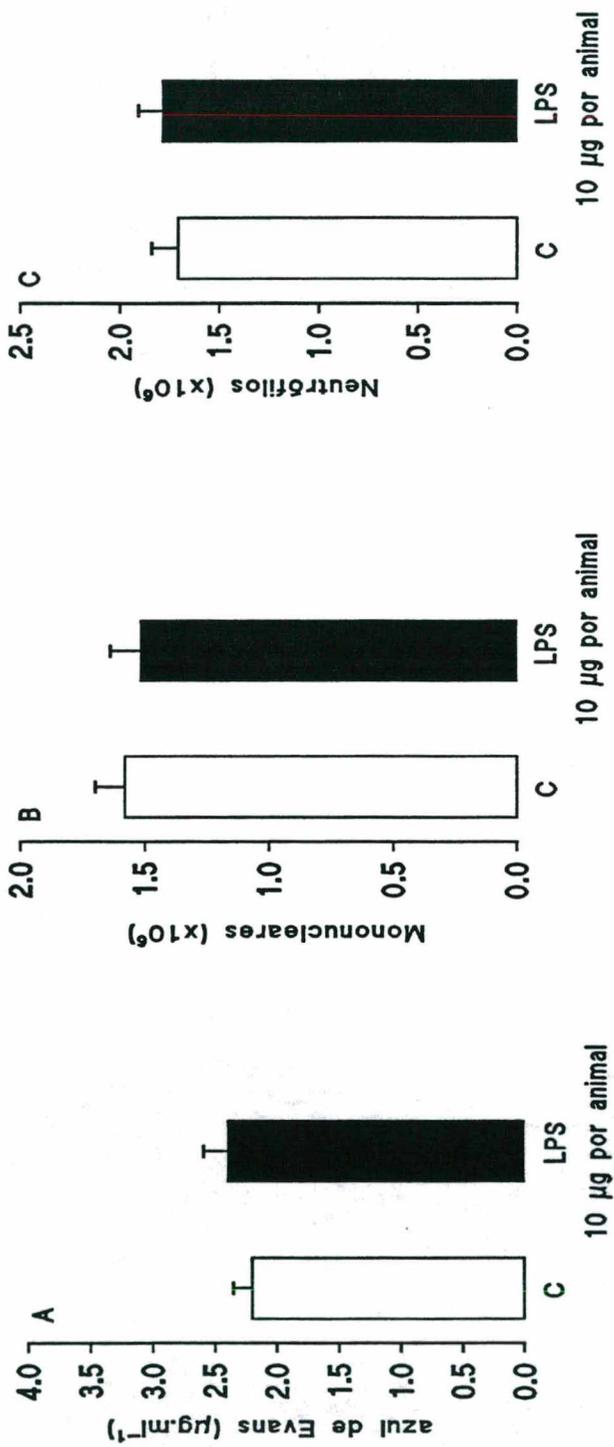


Figura 4a- Efeito do tratamento prévio com LPS de *Escherichia coli* (10 µg por animal) na pleurisia induzida pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos. Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) na ausência ( C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção intravenosa de LPS 24 h antes da indução da pleurisia. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.

\*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

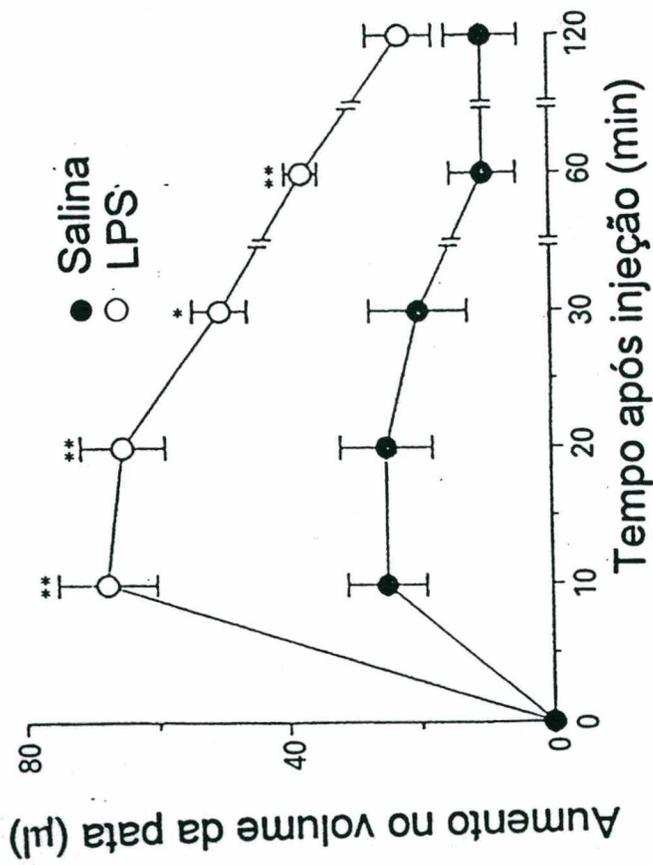


Figura 4b- Perfil temporal do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de des-Arg<sup>9</sup>-BK (50 nmol por pata) em camundongos, em animais pré-tratados com LPS de *Escherichia coli* (10 µg por animal) 24 h antes, ou com salina estéril. Os valores representam a diferença entre os volumes (µl) dos animais que receberam injeção intraplantar de salina e do agonista seletivo B<sub>1</sub> nas patas. ( S ) pré-tratados com veículo, (LPS) pré-tratados com injeção intravenosa de LPS 24 h antes da indução do edema de pata.. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cavidade) foi administrada 60 minutos antes do pico de 4 h. Porém, quando o antagonista foi injetado 30 minutos antes do pico de 4h, não foi observada inibição da migração destas células. A des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cavidade) administrada 30 ou 60 minutos antes do pico do influxo de neutrófilos em 4 h, também foi capaz de inibir significativamente a migração destas células.

Deste modo, a percentagem de inibição causada pela des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cavidade) sobre o extravasamento plasmático através de injeção em associação com o agonista seletivo B<sub>1</sub>, foi de 52.0 ± 1.6% (P<0.01) (figura-5A). Quando a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cavidade) foi administrada 30 ou 60 minutos antes do pico da migração de células inflamatórias 4 h após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) as percentagens de inibição foram as seguintes: 6.4 ± 1.1 para 30 minutos (P>0.05), e 36.8 ± 1.2% para 60 minutos (P<0.01) para as células mononucleares (figura- 5B); e 15.0 ± 1.3% para 30 minutos e 25.8 ± 1.4% para 60 minutos (P<0.01) para neutrófilos (figura-5C). A administração de uma dose maior de des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (100 nmol por cavidade) foi capaz de inibir de forma significativa a migração das células inflamatórias

para a cavidade pleural dos animais. Assim ficou demonstrado que este efeito acontece de maneira dose-dependente, embora a inibição do exsudato não tenha ocorrido de forma proporcional à dose. Deste modo, a percentagem de inibição observada para a dose de 100 nmol por cavidade deste antagonista sobre o exsudato foi de  $49.8 \pm 1.9\%$ , ( $P < 0.01$ ) (figura -6 A) e sobre as células inflamatórias foram as seguintes:  $52.1 \pm 1.3\%$  ( $P < 0.01$ ) para as células mononucleares, figura-6B; e  $38.9 \pm 1.1\%$  ( $P < 0.01$ ) para os neutrófilos, (figura-6C).

A injeção i.t. de outro antagonista seletivo do receptor  $B_1$ , a des-Arg<sup>9</sup>NPC 17731 (5 nmol por cavidade), foi também eficaz em inibir significativamente o extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK no pico de 1 h, bem como a migração celular quando analisada 4 h após a injeção intratorácica do agonista. A co-injeção de des-Arg<sup>9</sup>NPC 17731 (5 nmol por cavidade) e des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) inibiu o extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em ( $46.3 \pm 1.5\%$ ) ( $P < 0.01$ ) (figura-7A). Quando a des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (5 nmol por cavidade) foi administrada 30 e 60 minutos antes do pico do influxo das células inflamatórias (4 h), observou-se inibição significativa do número

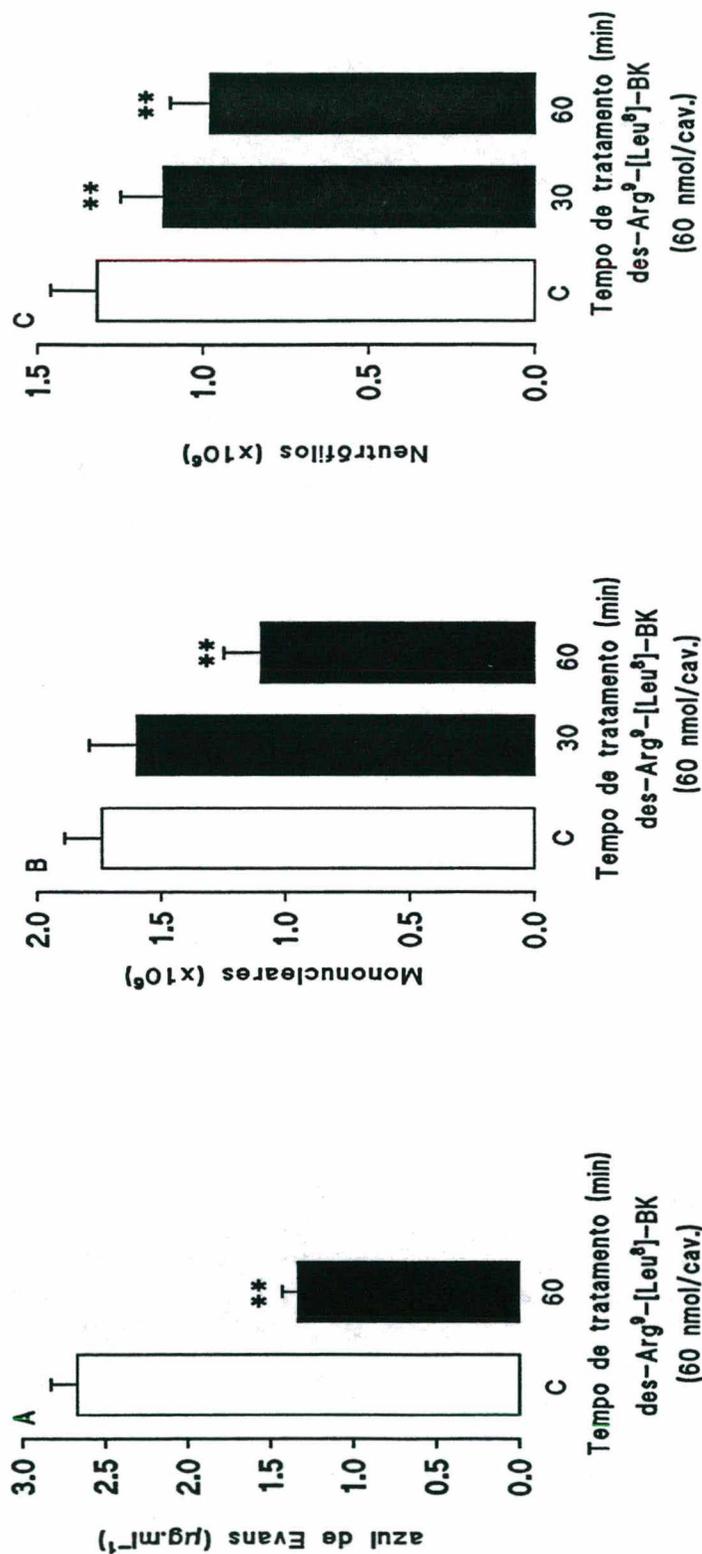


Figura 5- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzido pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 nmol por cav.) administrado 30 e 60 min antes do pico das células (4 h) ou por co-injeção para o extravasamento plasmático (1h) na cavidade pleural de camundongos induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação ao grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

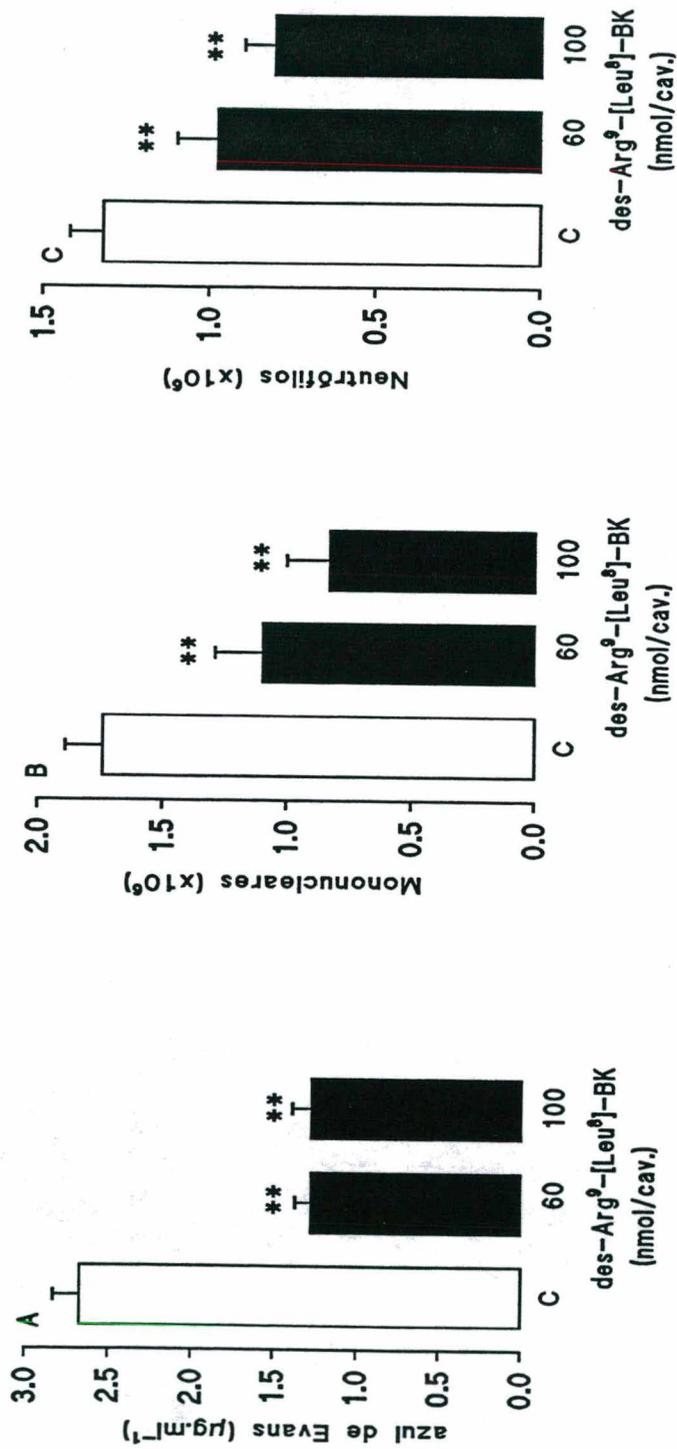


Figura 6- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 a 100 nmol por cav.) administrado 60 min antes do pico das células (4 h) ou por co-injeção para o extravasamento plasmático (1h) na cavidade pleural de camundongos induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m..\*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

de células: ( $57.8 \pm 1.5\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 30 minutos e ( $71.2 \pm 2.0\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 60 minutos para o total de células; ( $44.3 \pm 2.3\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 30 minutos e ( $64.6 \pm 2.2\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 60 minutos, para células mononucleares (figura-7B); e ( $69.7 \pm 1.1\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 30 minutos e ( $76.6 \pm 2.0\%$ ) ( $P < 0.01$ ) para 60 minutos para neutrófilos, (figura-7C). A administração de uma dose mais alta de des-Arg<sup>9</sup>NPC 17731 (20 nmol por cavidade), ao contrário do efeito anterior, potencializou a ação da des-Arg<sup>9</sup>-BK em todos os parâmetros estudados na pleurisia induzida pelo agonista em camundongos (tabela-1).

A administração do HOE 140 (30 nmol por cavidade) 30 minutos antes da indução da pleurisia não foi capaz de interferir significativamente no extravasamento plasmático no pico de 1 h, e nem com o número de células mononucleares ou de neutrófilos no pico de 4 h induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK, (figura-8A, B e C).

As injeções intratorácicas de des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 e 100 nmol por cavidade), de des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (5 nmol por cavidade) ou de HOE 140 (30 nmol por cavidade) não causaram qualquer efeito “*per se*” sobre o número total de células em 4 h ou sobre o aumento do extravasamento

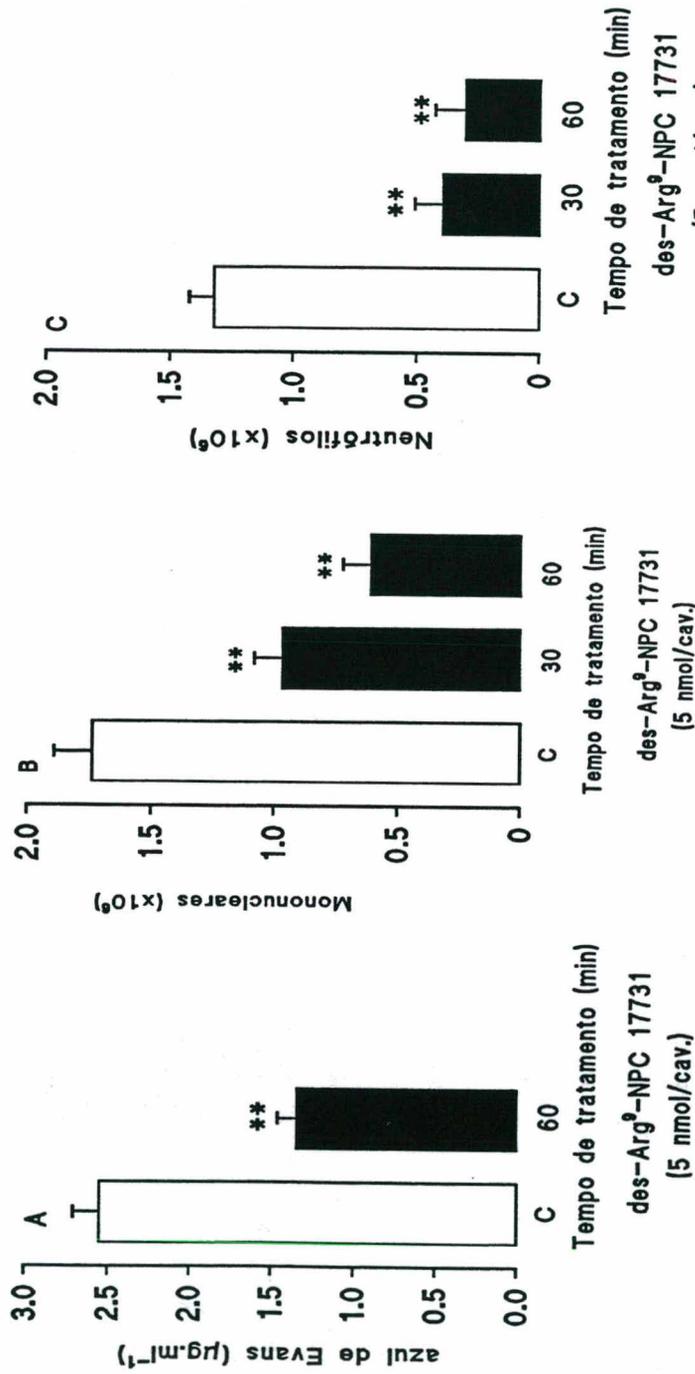


Figura 7- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) de des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (5 nmol por cav.) administrado 30 e 60 min antes do pico das células (4 h) ou por co-injeção para o extravasamento plasmático (1h), na cavidade pleural de camundongos induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

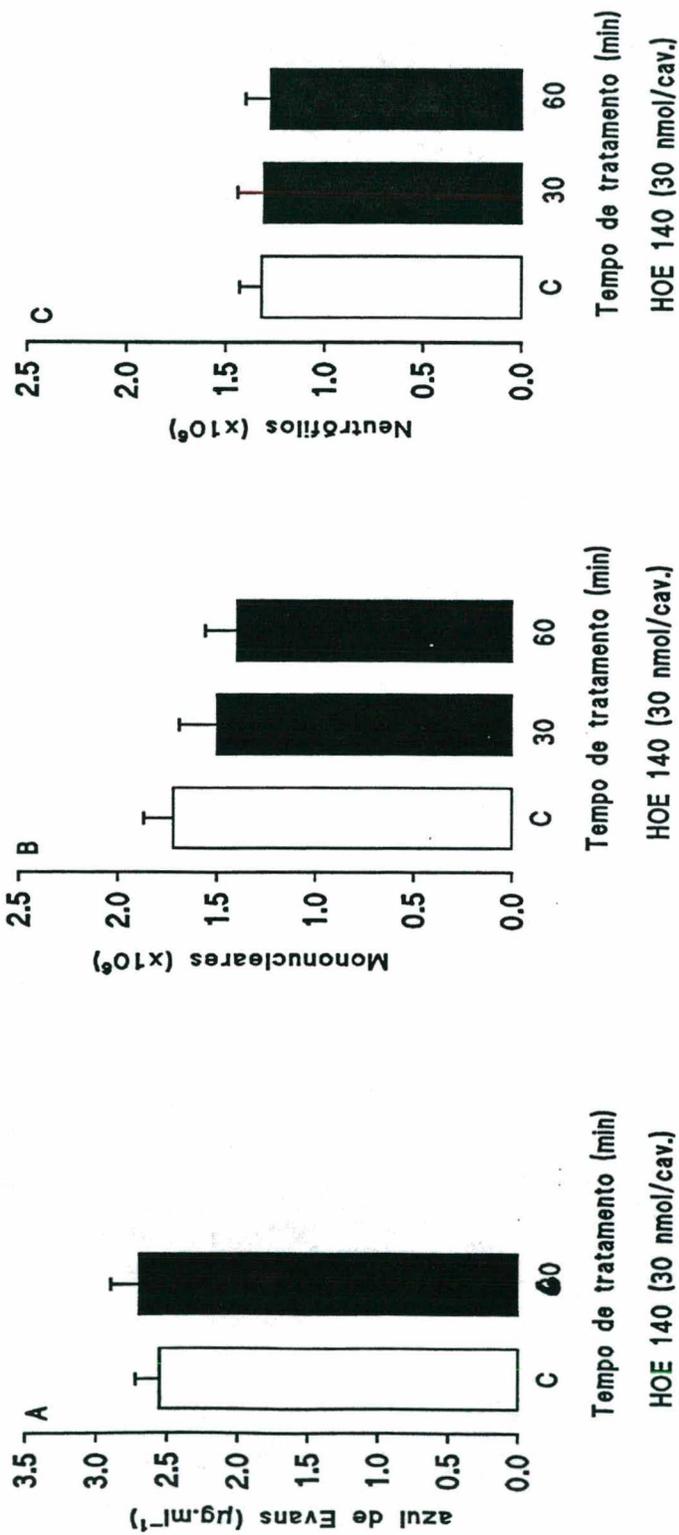


Figura 8- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de HOE 140 (30 nmol por cav.) administrado 30 e 60 min antes do pico das células (4 h) ou por co-injeção para o extravasamento plasmático (1h) na cavidade pleural de camundongos induzidos pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

plasmático com o pico em 1 h, quando comparado com o grupo de animais que recebeu injeção intratorácica de salina (tabela-1).

Tabela-1: Efeitos da injeção i.t. de antagonistas seletivos para os subtipos de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas, analisados 1 h e 4 h após a injeção, na cavidade pleural de camundongos.

Antagonistas	Azul de Evans μg/ml	Células Mononucleares (x 10 <sup>6</sup> )	Células PMN (x 10 <sup>6</sup> )
Controle	1.0 ± 0.05	1.2 ± 0.17	0.11 ± 0.04
des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-BK (60 nmol/cav.)	1.1 ± 0.07	1.48 ± 0.11	0.22 ± 0.07
des-Arg <sup>9</sup> -NPC17731 (5 nmol/cav.)	1.2 ± 0.03	1.1 ± 0.12	0.13 ± 0.06
des-Arg <sup>9</sup> -NPC17731 (20 nmol/cav.)	1.7 ± 0.05**	2.1 ± 0.10**	0.62 ± 0.03**
HOE 140 (30 nmol/cav.)	0.9 ± 0.05	1.0 ± 0.14	0.21 ± 0.06

Os valores apresentados representam as médias ± e.p.m. n=4 animais por grupo. Todas as drogas foram administradas por via intratorácica; a análise do extravasamento plasmático e da migração de células para a cavidade pleural dos animais foi realizada 1 h ou 4 h após a injeção, respectivamente. As diferenças estatísticas são indicadas por asteriscos. \*\* P<0.01.

#### 4.4. Envolvimento dos neuropeptídeos sensoriais na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK.

A injeção intratorácica dos antagonistas seletivos para os receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, FK 888 (1 nmol por cavidade), NK<sub>2</sub>, SR 48968 (20 nmol por cavidade) ou NK<sub>3</sub>, SR 142801 (10 nmol por cavidade) (Saleh, 1997), administrados 5 minutos antes da indução da pleurisia pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) antagonizou a migração de neutrófilos em (72.6 ± 2.1%), (62.9 ± 1.8%) e (86.7 ± 1.8%), respectivamente, (P < 0.01) quando analisado 4 h após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (figuras- 9C, 10C e 11C). Além disso, o número de células mononucleares foi significativamente inibido pelo FK 888, bem como pelo SR 142801 em (74.6 ± 2.3%) e (72.7 ± 1.9 %), (P < 0.01), (figuras- 9B e 11B). Porém, o antagonista taquicinérgico seletivo para o receptor NK<sub>2</sub>, o SR 48968 (20 nmol por cavidade), não foi capaz de inibir significativamente o influxo de células mononucleares para a cavidade pleural dos animais (figura- 10B).

Por outro lado o extravasamento plasmático causado pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK no pico de 1 h não foi inibido significativamente pelos antagonistas de receptores NK<sub>1</sub>, (FK 888, 1 nmol por cavidade), ou pelo

NK<sub>2</sub>, (SR 48968, 20 nmol por cavidade), porém foi significativamente reduzido pelo antagonista NK<sub>3</sub>, (SR 142801, 10 nmol por cavidade) em (27.4 ± 2.2 %) (P<0.05), (figuras- 9A, 10A e 11A).

O extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade) com pico em 1 h foi significativamente inibido pela injeção intratorácica de CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cavidade), um antagonista seletivo para o receptor CGRP, quando este foi administrado 5 minutos antes da indução do processo inflamatório. O efeito inibitório do CGRP<sub>8-37</sub> sobre o extravasamento de azul de Evans foi de (21.9 ± 2.1%) (P < 0.01), (figura- 12A).

A administração do CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cavidade) 5 minutos antes da indução da pleurisia não interferiu significativamente na migração de células inflamatórias para a cavidade pleural dos animais 4 h após a injeção intratorácica do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub>, (figura-12B e C).

A co-injeção do antagonista seletivo para o receptor NK<sub>3</sub>, SR 142801 (10 nmol por cavidade) em associação com o antagonista seletivo para o receptor CGRP<sub>1</sub>, o CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cavidade) não foi capaz de promover uma inibição adicional do extravasamento plasmático, quando comparado ao efeito exercido por estes antagonistas injetados isoladamente

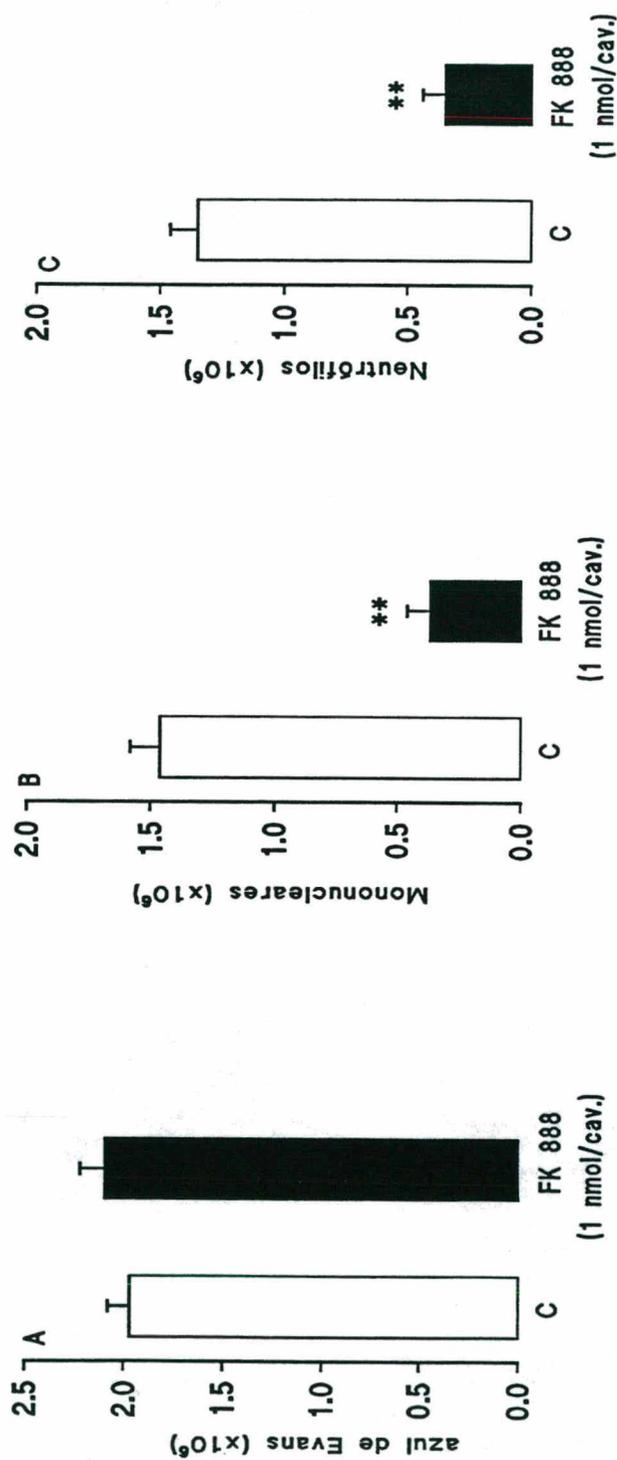


Figura 9- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de (FK 888,1 nmol por cav.) , administrado 5 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

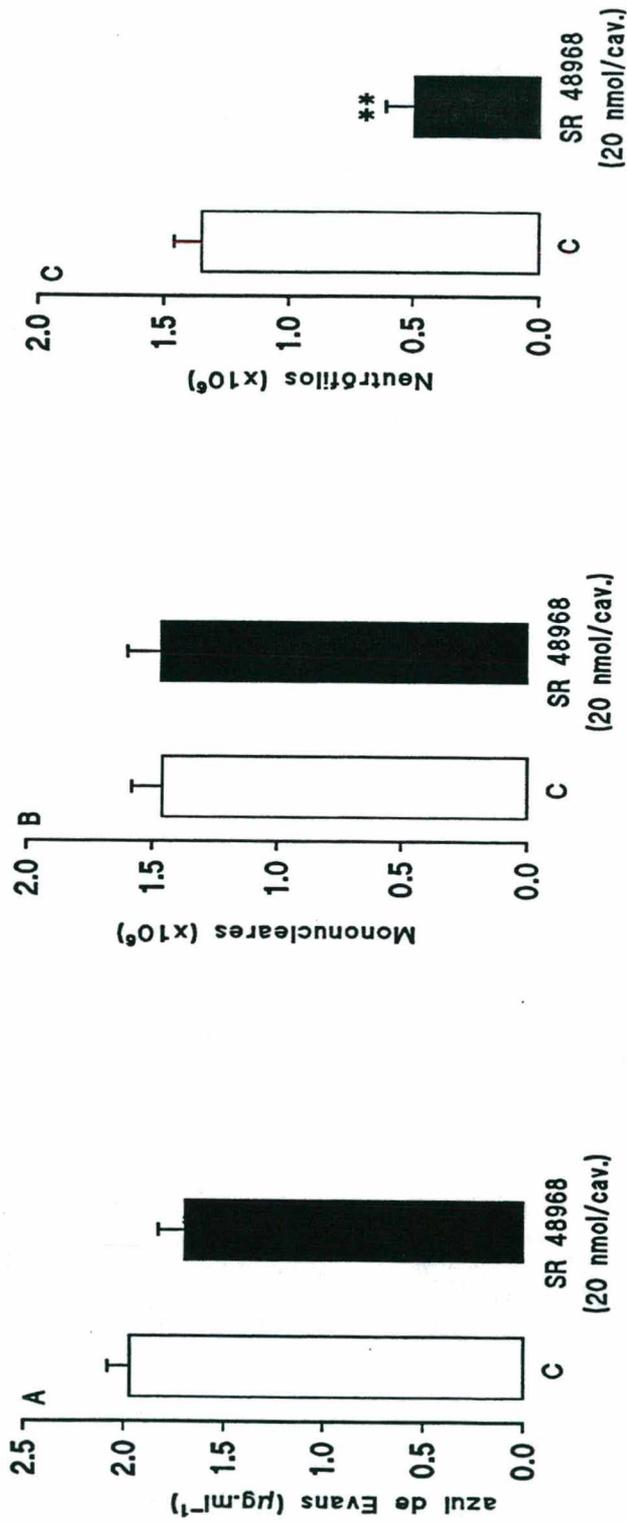


Figura 10- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de SR 48968 (20 nmol por cav.), administrado 5 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK cavidade pleural de camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

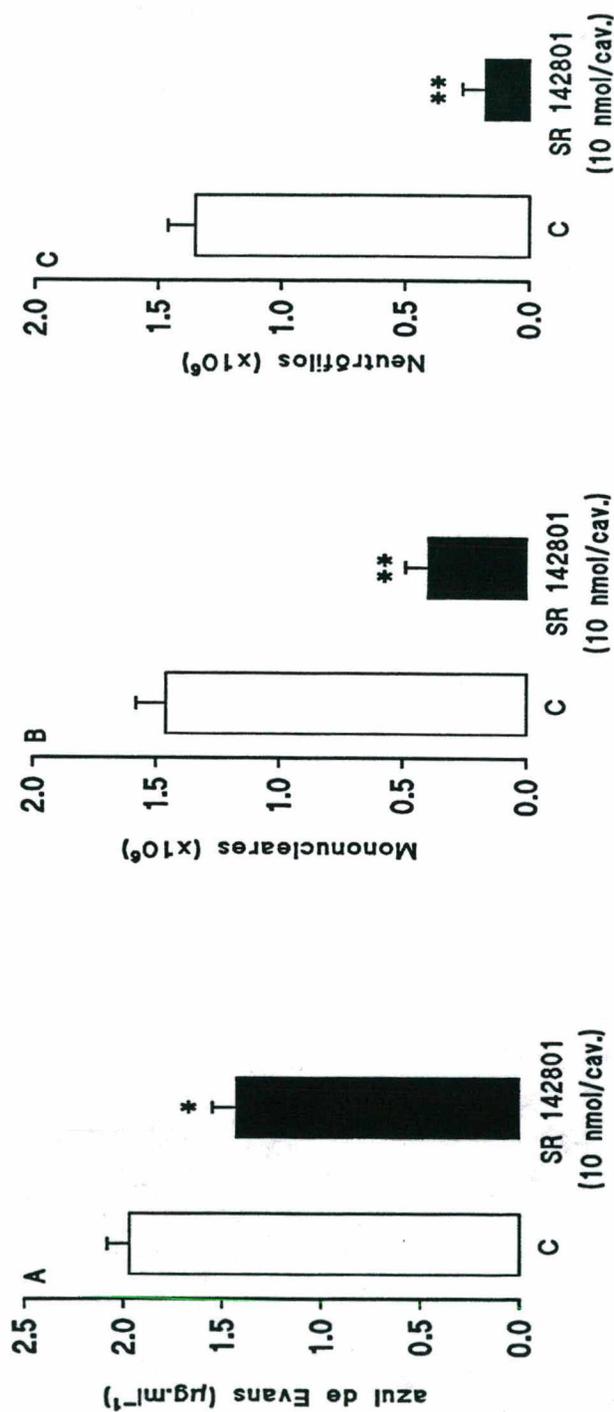


Figura 11- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzido pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de SR 142801 (10 nmol por cav.), administrado 5 min antes da indução da pleurisia pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

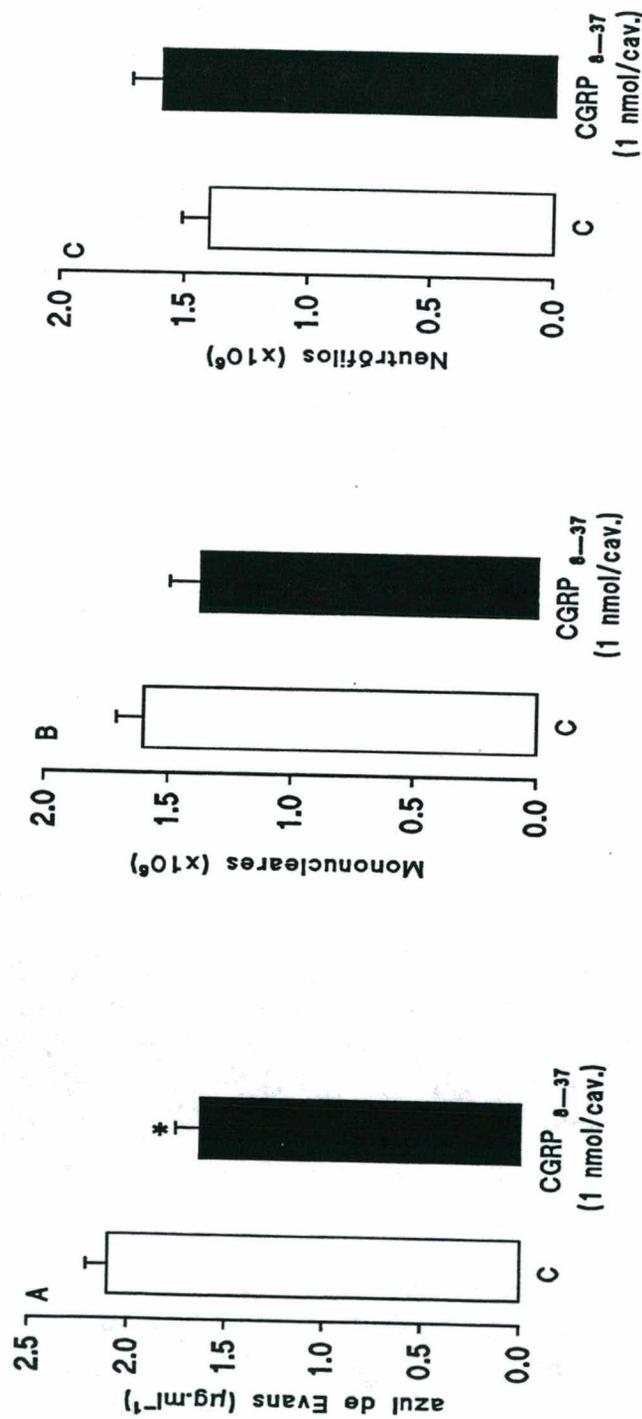


Figura 12- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzidos pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cav.), administrado 5 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam a diferença estatística em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

em outros grupos de animais na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade).

Outros grupos de animais receberam injeção intratorácica dos antagonistas seletivos taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, FK 888 (1 nmol por cavidade), NK<sub>2</sub>, SR 48968 (20 nmol por cavidade) ou NK<sub>3</sub>, SR 142801 (10 nmol por cavidade ou (30 nmol por cavidade), bem como do CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cavidade) separadamente. Estes antagonistas, com exceção do antagonista NK<sub>3</sub> na dose de 30 nmol por cavidade, não afetaram significativamente o extravasamento plasmático quantificado no pico de 1h, nem tampouco modificaram a cinética celular na cavidade destes animais no pico de 4 h, quando comparados com o grupo de animais que recebeu injeção intratorácica de salina. No entanto, o FK888 ocasionou um pequeno aumento no extravasamento plasmático, porém não de forma significativa. Estes resultados estão apresentados na (tabela -2).

Tabela-2: Efeitos da injeção i.t. dos antagonistas taquicinérgicos seletivos para os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> e para o CGRP, analisados 1 h e 4 h após, na cavidade pleural de camundongos.

Antagonistas	Azul de Evans μg/ml	Células Mononucleares (x 10 <sup>6</sup> )	Células PMN (x 10 <sup>6</sup> )
Controle	1.0 ± 0.05	1.21 ± 0.11	0.12 ± 0.03
FK 888 (1 nmol/cav.)	1.3 ± 0.04	1.06 ± 0.12	0.18 ± 0.08
SR 48968 (20 nmol/cav.)	1.2 ± 0.07	0.72 ± 0.09	0.11 ± 0.10
SR 142801 (10 nmol/cav.)	1.1 ± 0.05	1.41 ± 0.12	0.10 ± 0.05
SR 142801 (30 nmol/cav.)	1.5 ± 0.03*	1.52 ± 0.11*	0.48 ± 0.06*
CGRP <sub>8-37</sub> (1 nmol/cav.)	0.9 ± 0.06	1.1 ± 0.09	0.11 ± 0.03

Os valores apresentados representam as médias ± e.p.m. n=4 animais por grupo. Todas as drogas foram administradas por via intratorácica; a análise do extravasamento plasmático e da migração de células para a cavidade pleural dos animais foi realizada 1 h ou 4 h após a injeção, respectivamente.

As diferenças estatísticas estão indicadas por asteriscos. \*P<0.05.

#### 4.5. Envolvimento do óxido nítrico na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK.

##### a-Efeito de inibidores das óxido nítrico sintases.

A injeção intratorácica de L-NOARG (1 pmol por cavidade), um inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases, quando administrado 30 minutos antes da indução da pleurisia, não exerceu efeito significativo sobre o extravasamento plasmático promovido pela injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK no pico de 1 h (figura- 13A). Entretanto, a administração de L-NAME (1 pmol por cavidade) 30 minutos antes da indução da pleurisia, foi eficaz em inibir o extravasamento plasmático em  $(30.1 \pm 1.5\%)$ , ( $P < 0.01$ ) (figura- 14A). No entanto, ambos os inibidores das óxido nítrico sintases preveniram completamente a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais quando analisados 4h após a injeção intratorácica do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> das cininas.

A percentagem de inibição do influxo de neutrófilos causada pela L-NOARG (1 pmol por cavidade) foi de  $94.8 \pm 1.8\%$ , enquanto que a causada pela L-NAME foi de  $(98.5 \pm 2.1 \%)$  ( $P < 0.01$ ), (figuras- 13 C e 14 C), respectivamente.

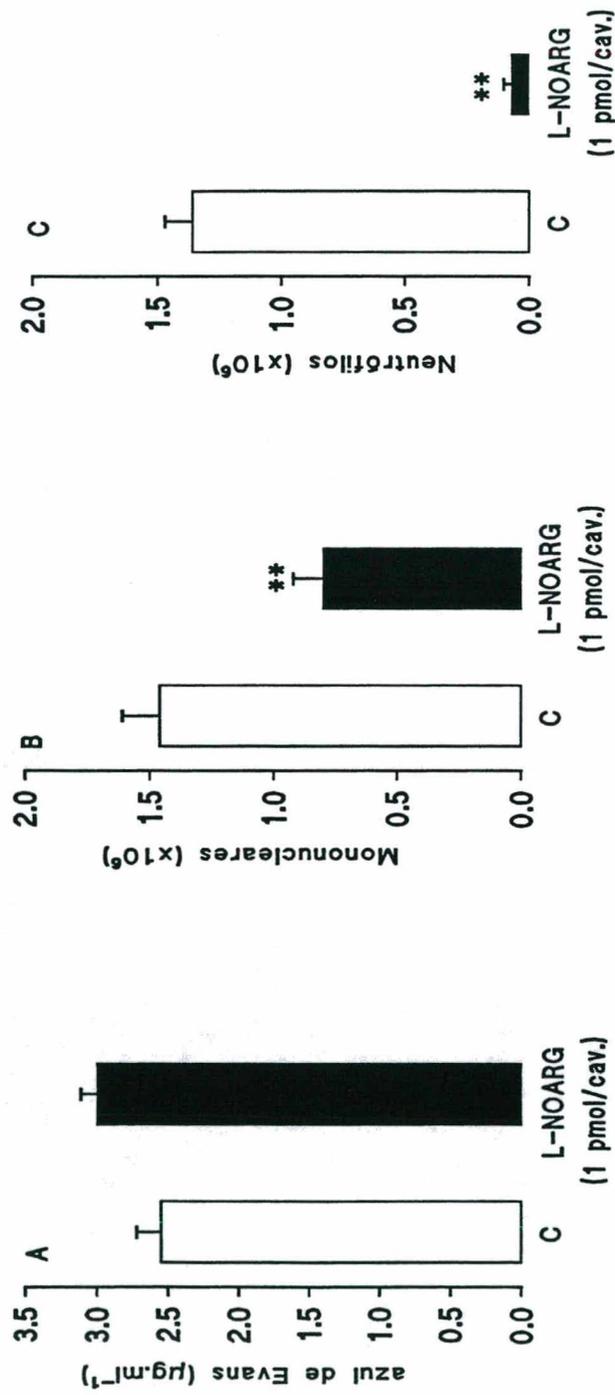


Figura 13- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de L-NOARG (1 pmol por cav.) , administrado 30 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m..\*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

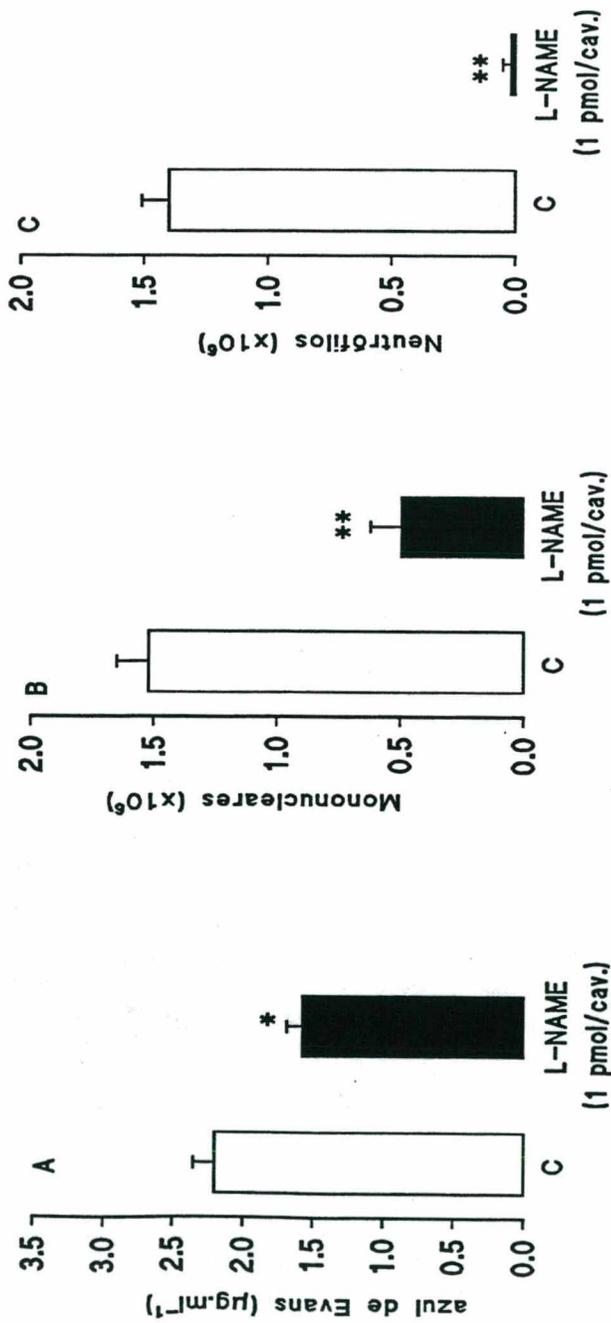


Figura 14- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de L-NAME (1 pmol por cav.), administrado 30 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

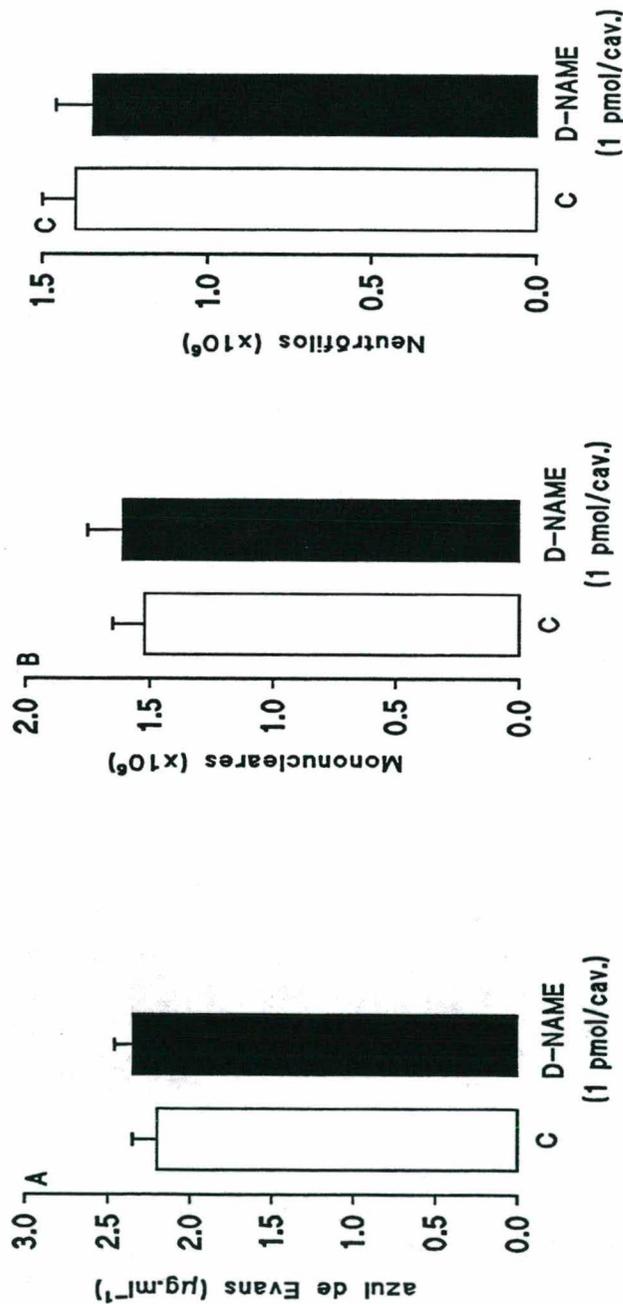


Figura 15- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção i.t. de D-NAME (1 pmol por cav.), administrado 30 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

Os efeitos da L-NOARG (1 pmol por cavidade) ou da L-NAME (1 pmol por cavidade) , administradas seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente, foram também significativos sobre a migração de células mononucleares na cavidade pleural dos animais no pico de 4h, ( $45.3 \pm 2.1\%$  e  $66.1 \pm 1.8\%$ ), ( $P < 0.01$ ), respectivamente, (figura-13 B e 14 B). A injeção intratorácica do D-enantiômero , D-NAME (1 pmol por cavidade), não teve nenhuma influência sobre a resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK com relação a todos os parâmetros estudados (figura- 15A, B e C).

A administração de L-NOARG, L-NAME ou de D-NAME, todos administrados na dose de (1 pmol por cavidade), não foi capaz de causar extravasamento plasmático analisado 1 hora após suas injeções intratorácicas. Com este protocolo de administração dos inibidores da óxido nítrico sintase também não foi observado influxo de células para a cavidade pleural dos animais 4 horas após a injeção intratorácica, similarmente aos grupos de animais que receberam injeção intratorácica de salina, conforme (tabela-3):

Tabela-3: Efeitos da injeção i.t. dos inibidores da óxido nítrico sintase, analisados 1 h e 4 h após, na cavidade pleural de camundongos.

Inibidores da óxido nítrico sintase	Azul de Evans μg/ml	Células Mononucleares (x 10 <sup>6</sup> )	Células PMN (x 10 <sup>6</sup> )
Controle	1.0 ± 0.05	1.2 ± 0.11	0.1 ± 0.03
L-NOARG			
(1 pmol/cav.)	1.1 ± 0.05	0.91 ± 0.08	0.19 ± 0.04
L-NAME			
(1 pmol/cav.)	1.2 ± 0.04	1.0 ± 0.05	0.15 ± 0.06
D-NAME			
(1 pmol/cav.)	1.0 ± 0.03	1.1 ± 0.04	0.12 ± 0.03

Os valores apresentados representam as médias ± e.p.m. n=4 animais por grupo. Todas as drogas foram administradas por via intratorácica; a análise do extravasamento plasmático e da migração de células para a cavidade pleural dos animais foi realizada 1 h ou 4 h após a injeção, respectivamente.

b-Determinação dos níveis de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) no extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

Os níveis de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) no exsudato pleural de camundongos após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cavidade), aumentaram significativamente nos períodos de 15 e 30 minutos após a administração desse peptídeo, quando comparado aos mesmos valores obtidos de animais que receberam injeção intratorácica de salina estéril (figura- 16). Contudo, os níveis de nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) retornaram ao nível basal no exsudato pleural coletado 60 minutos após a injeção intratorácica do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> para as cininas.

4.6. Envolvimento dos produtos da ciclooxigenase na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK.

O tratamento dos animais com indometacina ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), um inibidor não seletivo das ciclooxigenases administrado 1 hora antes da indução da pleurisia por via intraperitoneal, não foi capaz de inibir o extravasamento plasmático no pico de 1 h (figura-17A). Entretanto, o influxo de células mononucleares para a cavidade pleural dos animais no pico de 4 h foi inibido em  $(47.3 \pm 2.1\%)$  ( $P < 0.05$ ), (figura-17B).

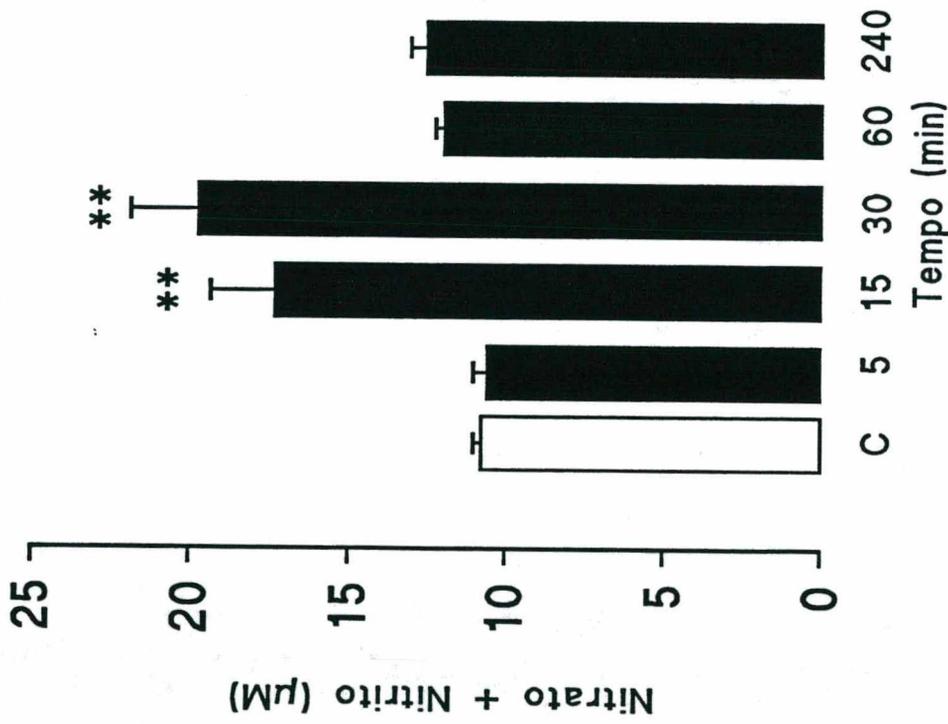


Figura 16- Perfil temporal do nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) presente no exsudato da cavidade pleural após 5, 15, 30, 60, ou 240 min da injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) em camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo salina. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ .

Surpreendentemente, a migração de neutrófilos 4 h após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK foi aumentada em ( $35.9 \pm 2.5\%$ ) ( $P < 0.01$ ) com o tratamento prévio com a indometacina (figura-17 C).

#### 4.7. Possível envolvimento da histamina na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK.

A administração de terfenadina, um antagonista do receptor H<sub>1</sub> da histamina, na dose de ( $50 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, não foi capaz de interferir significativamente no extravasamento plasmático medido 1 h após a indução da pleurisia (figura-18A). Da mesma forma a migração de células mononucleares ou de neutrófilos, no pico de 4 h após a indução da pleurisia, também não foi modificada pela administração do anti-histamínico (figura-18B e C), ( $P > 0.05$ ).

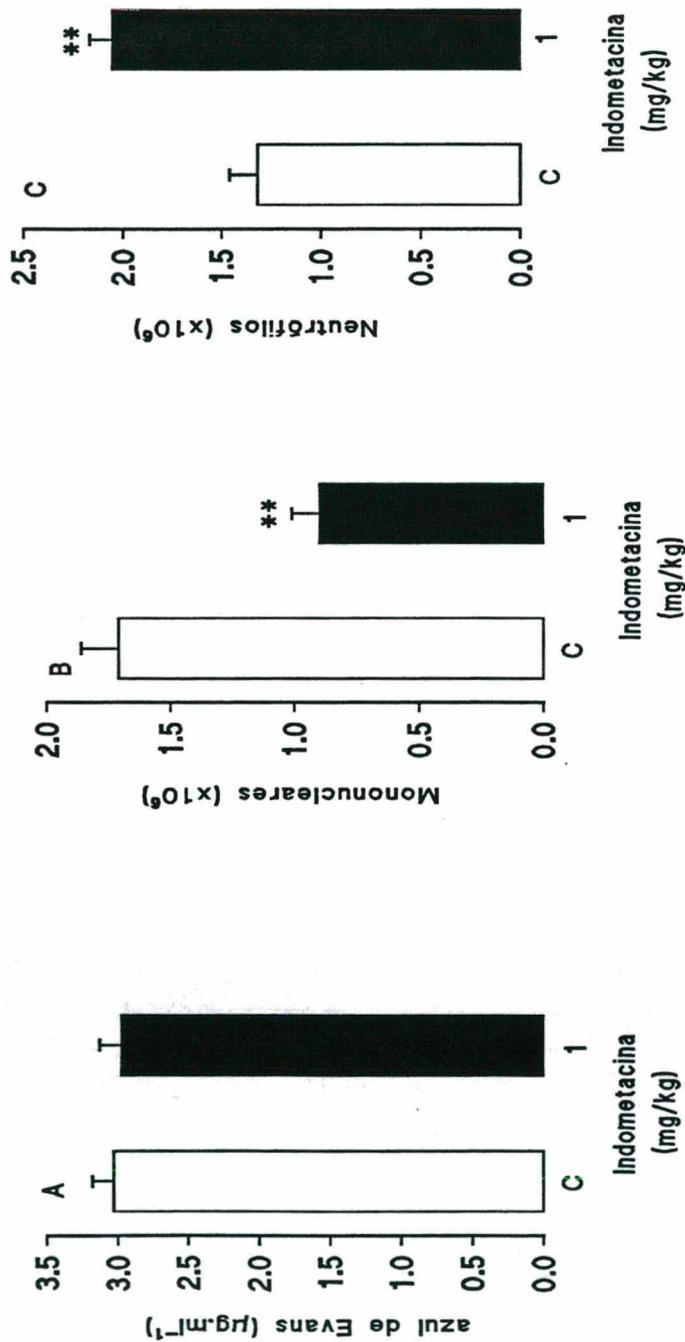


Figura 17- Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares ( B ), e migração de neutrófilos ( C ) induzidos pela injeção i.t.de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção de indometacina (1 mg/kg, i.p.) administrada 1 h antes da indução da pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m..\*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

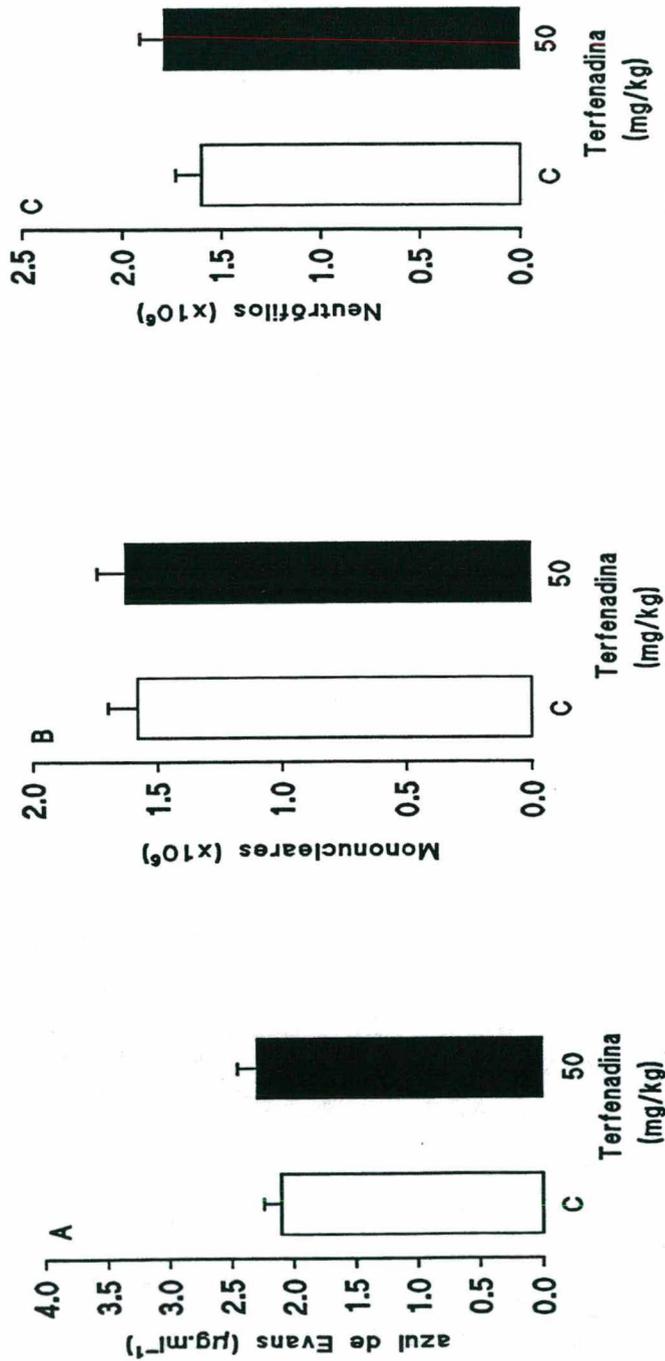


Figura 18 - Extravasamento de azul de Evans (A), migração de células mononucleares (B), e migração de neutrófilos (C) induzidos pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.) na cavidade pleural de camundongos na ausência (C, coluna aberta) ou na presença (coluna fechada) da injeção de terfenadina (50 mg/kg) por via intraperitoneal, administrado 30 min antes da injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos. Os asteriscos sobre cada coluna indicam os níveis de significância em comparação com o grupo controle. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais com os valores de e.p.m.. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01.

## 5. DISCUSSÃO

É amplamente conhecido que a bradicinina e cininas a ela relacionadas participam de vários processos fisiopatológicos. Assim, as cininas estão envolvidas em uma grande variedade de respostas em vários tipos de células. Elas exercem por exemplo um papel importante no controle do tônus da musculatura lisa vascular e não vascular, controlam a pressão arterial principalmente através da liberação de óxido nítrico, participam de vários processos inflamatórios, na transmissão da dor e hiperalgesia (para revisão ver: Hall, 1992; Hall, 1997; Steranka et al., 1988). Além disso, as cininas são capazes de aumentar a produção de eicosanóides em fibroblastos (Lerner e Modeer, 1991; Bathon et al., 1992), ou ainda em células endoteliais (Cahill et al., 1988; D'Orléans-Juste et al., 1989).

As ações pró-inflamatórias das cininas são mediadas através dos seus dois subtipos de receptores, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Regoli e Barabé; 1980). Esses efeitos ocorrem por ação das cininas na musculatura lisa, ou no endotélio microvascular promovendo a liberação de substâncias pró-inflamatórias como o óxido nítrico, um potente vasodilatador, e de prostanóides como a prostaglandina E<sub>2</sub> e a prostaciclina. Existem também evidências sugerindo

que as ações inflamatórias das cininas envolvem a liberação antidrômica de neuropeptídeos tais como as taquicininas e do CGRP liberados das fibras nervosas sensoriais. A liberação destes neuropeptídeos contribuem para o extravasamento plasmático e para a vasodilatação (Geppetti, 1993; Dray e Perkins, 1993), como também para a adesão de leucócitos no endotélio venular (Suzuki et al., 1994).

Os efeitos predominantes das cininas sobre a circulação variam de acordo com o tipo de leito vascular. Em grandes artérias e veias, elas possuem efeito direto contrátil, enquanto que em pequenos vasos, e sobretudo na microcirculação, predomina o efeito indireto. Este efeito é vasodilatador, sendo mediado via liberação de óxido nítrico ou de prostanóides. Nas vênulas o efeito preponderante das cininas é o aumento da permeabilidade vascular com conseqüente extravasamento plasmático, sendo este um efeito observado após uma agressão inflamatória, ou também por uma lesão tecidual (para revisão ver: Hall, 1992; Hall e Morton, 1997; Steranka e Burch, 1991).

Com relação às ações das cininas nas vias aéreas, existem inúmeros trabalhos indicando que esses peptídeos, atuando principalmente nos receptores do subtipo B<sub>2</sub>, exercem um papel importante no sistema

respiratório, o que sugere um envolvimento direto em algumas patologias como por exemplo na asma e na alergia (Geppetti, 1993; Polosa et al., 1996; Farmer, 1994). Contudo, pouco é conhecido a respeito do papel exercido pelos receptores  $B_1$  para as cininas nos processos fisiológicos e/ou patológicos nas vias aéreas.

Os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez que a injeção intratorácica do agonista seletivo do receptor  $B_1$  para as cininas, a des-Arg<sup>9</sup>-BK, causou em camundongos, uma importante reação inflamatória, caracterizada por aumento da exsudação (com pico em 1 h) seguido da migração de células, principalmente neutrófilos (com pico em 4 h). Estas células permaneceram na cavidade até 24 h após a injeção i.t. do agonista, e o processo inflamatório ficou resolvido após 48 h.

No presente estudo ficou demonstrado que as ações pró-inflamatórias causadas pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural em camundongos decorreu da ativação de receptores próprios constitutivos do subtipo  $B_1$ . Essa evidência foi baseada em alguns resultados que serão discutidos a seguir. O tratamento dos animais através da administração i.t. com a des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]-BK, um antagonista seletivo para o receptor  $B_1$  (Regoli e Barabé, 1980), e principalmente com a des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (Cabrini et al.,

1996; Cabrini e Calixto, 1997), outro antagonista seletivo para o receptor  $B_1$  das cininas, resultou em marcante diminuição tanto da exsudação quanto da migração de células inflamatórias para a cavidade pleural, em resposta à injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Ao contrário, o tratamento dos animais com o antagonista seletivo para os receptores  $B_2$ , o Hoe 140, em condições onde esse antagonista demonstrou previamente ser efetivo em inibir as ações das cininas (Saleh et al., 1997; Campos e Calixto, 1995b; Regoli et al., 1995), não foi capaz de interferir de maneira significativa com a resposta inflamatória causada pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Tais resultados indicam portanto que a resposta inflamatória causada pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos, é mediada por ativação dos receptores do subtipo  $B_1$ . Além disso, esses resultados estendem estudos anteriores descritos na literatura (Polosa et al., 1993; Polosa et al., 1996; Sato et al., 1996), e sugerem um papel relevante dos receptores do subtipo  $B_1$  no controle da resposta inflamatória nas vias aéreas.

Por outro lado, a resposta inflamatória causada pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos foi observada já nos 5 minutos após a injeção do peptídeo. Porém, é conhecido que ao contrário das ações mediadas pelos receptores  $B_2$ , os receptores  $B_1$  para as cininas são

normalmente induzidos após trauma tecidual ou em processos inflamatórios. Em muitas preparações com musculatura lisa as respostas mediadas pelos receptores B<sub>1</sub> ocorrem de maneira tempo-dependente. Tem sido demonstrado que em algumas imunopatologias ocorre a indução da expressão do receptor B<sub>1</sub>, processo esse regulado por síntese protéica (Marceau, 1995). Após incubação por longo período da veia mesentérica de coelho, foi determinada nestas células a presença de receptor B<sub>1</sub> através de estudos de *binding* com o agonista seletivo para este receptor marcado com trítio, o [<sup>3</sup>H] des-Arg<sup>9</sup>-BK, sendo este efeito caracterizado como tempo-dependente (Marceau e Regoli, 1991). Em outro tipo de células como na musculatura lisa da aorta de coelhos, foi também observada a indução da expressão destes receptores após um período de incubação da preparação (Schneck et al., 1994). Ainda, o tratamento prévio com LPS ou IL-1 $\beta$  de células da musculatura lisa da artéria mesentérica de coelhos (Galizzi et al., 1994), foi capaz de induzir a expressão dos receptores B<sub>1</sub> para as cininas. Estes estudos bioquímicos complementaram os experimentos funcionais de Bouthillier et al., (1987), que mostraram que a resposta contrátil induzida pelas cininas na aorta isolada de coelho aumentou progressivamente de maneira tempo-dependente. Em outros experimentos na aorta isolada de

coelho, a incubação do tecido com LPS, com IL-1 $\beta$ , ou com interferon gama (IFN $\gamma$ ), causou aumento da expressão do receptor B<sub>1</sub> para as cininas neste tecido (Levesque et al., 1995), sugerindo o envolvimento de citocinas neste processo. São escassos os tecidos e as espécies animais onde esses receptores encontram-se constitutivamente presentes, mas eles foram descritos, na artéria celíaca de coelho (Ritter et al., 1989), na veia mesentérica e artéria basilar de cão (Toda et al., 1987), em leito vascular pulmonar de felinos (Bracken et al., 1994), bem como em fibras sensíveis à capsaicina presentes em orelha de camundongo (Mantione e Rodriguez, 1990). Por outro lado, o tratamento prévio endovenoso de coelhos com LPS, foi capaz de induzir hipotensão em resposta à injeção de bolus do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub> (Regoli et al., 1981; Drapeau et al., 1991), enquanto que este tratamento prévio inflamatório não promoveu aumento do extravasamento plasmático na mesma espécie, após injeção intravascular de des-Arg<sup>9</sup>-BK (Audet, et al., 1997).

Outro resultado que reforça a presença do receptor B<sub>1</sub> na sua forma constitutiva, na cavidade pleural de camundongos, foi o fato de que a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK causou essencialmente a mesma resposta inflamatória nos animais que receberam injeção endovenosa de LPS de

*Escherichia coli* (10 µg por animal), 24 h antes da indução da pleurisia, quando comparados ao grupo controle. É relatado na literatura que o tratamento sistêmico com LPS induz a expressão de receptores B<sub>1</sub> em várias espécies, tanto nos estudos realizados *in vivo* (Regoli e Barabé, 1981; Campos, et al., 1995a; Campos et al., 1996) como *in vitro* (Bouthillier et al., 1987; Galizzi et al., 1994; Levesque et al., 1995; Cabrini et al., 1996). No presente estudo, utilizando esse mesmo protocolo para indução dos receptores B<sub>1</sub>, através do tratamento prévio dos animais com LPS, não foi possível observar nenhuma mudança significativa na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK que indicasse um aumento de indução desses receptores na cavidade pleural de camundongos. Entretanto, o mesmo tratamento em camundongos com LPS, resultou em aumento significativo do edema de pata causado pela injeção intraplantar de des-Arg<sup>9</sup>-BK, quando comparado com o grupo que recebeu injeção prévia com salina (Vianna e Calixto, 1998). Em outros estudos, demonstrou-se que a resposta mediada pelo receptor B<sub>1</sub> no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos (Campos et al., 1995a), ou em edema de pata em ratos (Campos et al., 1996), também foi aumentada pelo mesmo tratamento prévio dos animais com LPS. Por outro lado, em estudos realizados tanto *in*

*vivo* quanto *in vitro* com camundongos (Corrêa e Calixto, 1993; Maas et al., 1995), demonstraram a existência de receptores B<sub>1</sub> constitutivos. Pesquero e al., (1996), usando a técnica de RT-PCR, detectaram baixos níveis de mRNA para o receptor B<sub>1</sub> murino no tecido de animais não tratados, porém estes pesquisadores observaram um aumento significativo da transcrição deste receptor no coração, fígado, e pulmão, mas não nos rins dos animais tratados previamente com LPS. Estes dados indicam que o receptor B<sub>1</sub> murino pode ser encontrado nesta espécie, na sua forma constitutiva, mas seus níveis podem ser aumentados após tratamento sistêmico dos animais com LPS. Os dados encontrados no presente estudo, bem como aqueles descritos na literatura, sugerem que a presença do receptor B<sub>1</sub> na sua forma constitutiva ou induzida, depende não apenas da espécie, mas também do tipo de tecido e/ou célula dentro da mesma espécie em estudo. Deste modo, a caracterização do receptor B<sub>1</sub> na cavidade pleural de camundongos foi constatada pela inibição da resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK pelo antagonista seletivo, a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK. Além disso, a injeção i.t. do agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub>, causou efeito biológico detectável já a partir de 5 min após a indução da pleurisia, sendo que esta resposta não foi aumentada pelo tratamento prévio dos animais com LPS. Estes resultados

indicam, que o receptor do subtipo B<sub>1</sub> medeia a resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, e está presente na sua forma constitutiva na cavidade pleural de camundongos. Por outro lado, Shanstra et al. (1998) demonstraram em cultura de fibroblastos de pulmão humano, que o receptor B<sub>1</sub> tem sua expressão aumentada durante a estimulação prolongada com seu agonista seletivo, a des-Arg<sup>10</sup>-calidina, sendo este efeito completamente bloqueado pelo antagonista seletivo, a des-Arg<sup>10</sup>-(Leu<sup>9</sup>)-calidina. O aumento da expressão do receptor B<sub>1</sub> em humano foi identificado pelo aumento do RNAm e da proteína, bem como do cálcio citosólico. Uma vez inibido pelo antagonista seletivo, indica que o aumento da expressão destes receptores resultou da estimulação de uma população pré-existente de receptores B<sub>1</sub> na superfície das células, sendo um efeito mediado pela ativação do fator de transcrição NF-κB e de uma proteína quinase C. Seriam necessários estudos de biologia molecular, para verificar um possível aumento da expressão do receptor B<sub>1</sub> pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

Estudos de biologia molecular permitiram a clonagem do receptor B<sub>1</sub> em diversas espécies animais, incluindo em humanos (Menke et al., 1994), coelhos (MacNeil et al., 1995), e camundongos (Pesquero et al., 1996; Hess

et al., 1996 ). Contudo, existem divergências em relação a afinidade dos agonistas e dos antagonistas das cininas para os receptores  $B_1$  nas diversas espécies estudadas. Assim, os receptores  $B_1$  de humanos e de coelhos apresentam, respectivamente, cerca de 150 a 2000 vezes maior afinidade para o agonista seletivo de receptor  $B_1$ , a Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, quando comparado com a des-Arg<sup>9</sup>-BK. Ao contrário, o receptor  $B_1$  murino possui afinidade similar para a des-Arg<sup>9</sup>-BK e para a Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (Hess et al., 1996; Pesquero et al., 1996; Burch e Kyle, 1992).

De fato, Pesquero et al. (1996) sugeriram que estas diferenças de ação observadas entre as respostas para os agonistas seletivos dos receptores  $B_1$ , nas diversas espécies animais estudadas podem ser consequência de modificações existentes na sequência de aminoácidos para o receptor  $B_1$  encontrado nestas espécies. Acredita-se que a principal diferença entre a sequência de aminoácidos do receptor  $B_1$  murino e de humanos ou de coelhos, localiza-se na porção N-terminal, onde aparece uma inserção de oito aminoácidos no receptor  $B_1$  murino. Além disso, diferenças na sequência de aminoácidos da primeira alça intracelular e na porção C-terminal em relação ao receptor  $B_1$  das outras espécies como em humanos e coelho, podem causar diferenças na afinidade aos agonistas. Esses autores

demonstraram também que a seqüência de aminoácidos para o receptor B<sub>1</sub> de camundongos possui analogia de cerca de 68% a 73% com as seqüências de aminoácidos do receptor B<sub>1</sub> em coelhos e em humanos, respectivamente. Por outro lado, as diferenças para a seletividade dos agonistas em receptor B<sub>1</sub> humano ou murino pode também ser explicada pela diferença do ligante endógeno gerado nas duas espécies. Em ratos, são descritos dois genes para o precursor da BK, o K-cininogênio e o T-cininogênio (Furuto-Kato et al., 1985). O aa que precede a BK no K-cininogênio em ratos é a Arg, enquanto no T-cininogênio é a Ser. Recentemente, a seqüência de dois cDNAs para cininogênios foi clonada em camundongos, e ambos são similares ao K-cininogênio presente em ratos, e contém um resíduo de Arg que precede a molécula de BK (Hess et al., 1996). Deste modo, parece que nos roedores a lisil-BK está ausente. No nosso modelo experimental, observamos que a potência inflamatória na cavidade pleural de camundongos para a Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, outro agonista seletivo para o receptor B<sub>1</sub>, foi similar à des-Arg<sup>9</sup>-BK, confirmando os dados de biologia molecular discutidos anteriormente.

O sistema nervoso conhecido como não-adrenérgico, não-colinérgico (NANC), envolve vários neuropeptídeos da família das taquicininas, como a substância P (SP), neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB) e o peptídeo

relacionado ao gen da calcitonina (CGRP). A participação desses neuropeptídeos está atualmente bem caracterizada na transmissão deste sistema. Nas vias aéreas, por exemplo, a SP, a NKA, e o CGRP, estão co-localizados nas fibras nervosas sensoriais não mielinizadas. Estas fibras são responsáveis pela inervação dos compartimentos das paredes das vias aéreas desde a traquéia até os bronquíolos. As fibras nervosas sensoriais formam, portanto, um denso plexo na lâmina subepitelial, suprindo as glândulas, ramificando-se dentro da musculatura lisa e fazendo contato direto com os neurônios parassimpáticos pós-ganglionares, localizados no gânglio dorsal da medula. O sistema NANC pode ser ativado por diferentes agentes que estimulam as fibras nervosas sensoriais nas vias aéreas, levando à liberação local de taquicininas (Advenier et al., 1997). Estes neuropeptídeos são responsáveis em grande parte pelos vários efeitos biológicos no sistema broncopulmonar, como aumento da permeabilidade vascular por parte das vênulas pós-capilares, estimulação da secreção de glândulas, facilitação da neurotransmissão colinérgica, recrutamento e ativação de células inflamatórias. Além disso, a SP pode influenciar várias funções dos neutrófilos em humanos, incluindo a quimiotaxia, e a fagocitose (Geppetti, 1993; Advenier et al., 1997). A SP é conhecida por causar mudanças no

endotélio das vênulas pós-capilares, abrindo espaços no revestimento endotelial provavelmente por induzir contração das células endoteliais. Além disso, a SP promove a interação entre os leucócitos e o endotélio pelo aumento da expressão de moléculas de adesão em ambos, levando à migração dos leucócitos para o local inflamado (ver: Maggi, 1997). Recentemente, de Rose et al. (1994) mostraram que a adesão de neutrófilos nas células epiteliais bronquiais, um processo importante para a retenção dos leucócitos no sítio inflamatório, foi aumentado pela SP num efeito mediado pelo receptor taquicinérgico  $NK_1$  e através da expressão de moléculas de adesão. O influxo intrapulmonar de neutrófilos, induzido por lesões no complexo imune, foi ausente em estudos com camundongos que não possuem o gene para o receptor taquicinérgico  $NK_1$ , mostrando a importância do mesmo em processos inflamatórios (Bozic et al., 1996).

Nossos resultados também mostram que as ações inflamatórias causadas pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos foram significativamente inibidas pela administração dos antagonistas seletivos taquicinérgicos do subtipo  $NK_1$ , FK888 (Fujii et al., 1992; Murai et al., 1993),  $NK_2$ , SR 48968 (Advenier et al., 1992; Emonds-Alt et al., 1992; Kamikawa and Shimo, 1993), e em parte pelo novo

antagonista do subtipo  $NK_3$ , o SR 142801 (Emonds-Alt et al., 1995). Tais resultados reforçam, portanto, os dados descritos na literatura indicando que as ações das cininas mediadas tanto pela estimulação dos receptores  $B_2$  (Ichinose & Barnes, 1990; para revisão ver: Geppetti, 1993; Bertrand & Geppetti, 1996, Saleh et al., 1997), como também pelos receptores  $B_1$  (Mantione et al., 1990 e presente estudo), envolvem a liberação de taquicininas das fibras sensoriais. Além disso, foi também demonstrado no presente estudo que a administração do  $CGRP_{8-37}$ , antagonista seletivo para o subtipo  $CGRP_1$  do receptor do CGRP (Escott e Brain, 1993; ver: Wimalawansa, 1996), foi capaz de inibir o extravasamento plasmático causado pela des-Arg<sup>9</sup>-BK, indicando também uma possível participação do CGRP liberado de fibras nervosas sensoriais, na resposta inflamatória provocada pela des-Arg<sup>9</sup>-BK no modelo murino de pleurisia. Deste modo, os resultados do presente estudo mostram que a resposta inflamatória da des-Arg<sup>9</sup>-BK mediada pelo receptor  $B_1$  no modelo de pleurisia, envolve a ativação de fibras nervosas sensoriais, causando a liberação tanto de taquicininas, como de CGRP. Porém, existem algumas diferenças importantes no papel exercido por estes peptídeos na resposta inflamatória induzida pelo agonista seletivo  $B_1$ . Enquanto, os receptores  $NK_1$  e  $NK_3$

parecem exercer um papel modulatório importante na migração de neutrófilos e de células mononucleares para a cavidade pleural, os receptores NK<sub>2</sub>, por sua vez, participam apenas do controle do influxo de neutrófilos nesta resposta inflamatória. A vasodilatação promovida pelos neuropeptídeos na microvasculatura e subsequente extravasamento de proteínas plasmáticas, pode ser um componente crucial na inflamação neurogênica uma vez que mudanças no fluxo sanguíneo microvascular podem afetar a migração de células inflamatórias, de mediadores e o edema no sítio inflamatório (ver Maggi, 1997).

Por outro lado, o extravasamento plasmático presente na resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. do agonista seletivo B<sub>1</sub>, parece ser mediado pela ativação do receptor taquicinérgico NK<sub>3</sub> e do receptor do CGRP, uma vez que somente os antagonistas (SR 142801) e o (CGRP<sub>8-37</sub>) foram capazes de inibir este componente da resposta inflamatória promovida pelo agonista seletivo B<sub>1</sub> na cavidade pleural dos animais. Entretanto, estes antagonistas quando administrados conjuntamente não potencializaram o efeito inibidor, demonstrando a falta de sinergismo entre estes neuropeptídeos nesta resposta (resultados não apresentados). Deste modo, nossos resultados sugerem a participação de vários subtipos de

receptores para as neurocininas no modelo murino de pleurisia induzida pelo agonista seletivo do receptor  $B_1$ .

Além disso, enquanto a migração celular foi inibida pelo antagonista seletivo  $NK_1$ , o FK 888, este composto ocasionou um pequeno aumento do extravasamento plasmático nos animais previamente tratados com este antagonista. Este resultado sugere que este composto pode exercer atividade agonística na cavidade pleural de camundongos.

Várias evidências sugerem que muitos dos efeitos das cininas tanto os mediados pela ativação dos receptores  $B_1$  quanto aqueles mediados pelos receptores  $B_2$ , ocorrem através da liberação de NO ou de substâncias relacionadas (Sung et al., 1988; Khalil & Helme, 1992; Wiemer & Wirth, 1992; Schlemper & Calixto, 1994; Nakamura et al., 1996). É relatado que a produção de NO está aumentada em uma variedade de doenças, como por exemplo na asma, e vários sinais clássicos da inflamação são revertidos por inibidores das óxido nítrico sintases. Já foi descrito que o NO possui potente ação vasodilatadora na circulação bronquial e pode participar como regulador do fluxo sanguíneo nas vias aéreas (Barnes, 1995). Assim, o NO é capaz de induzir exsudação plasmática por aumento do fluxo sanguíneo para as vênulas pós-capilares além de produzir edema nas vias aéreas. Os

inibidores da síntese de NO aplicados na superfície das vias aéreas, aumentam o extravasamento plasmático, sugerindo que a liberação basal de NO exerce um efeito inibitório no extravasamento microvascular (ver: Barnes, 1995). Os resultados do presente estudo também mostram claramente a participação do NO na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK no modelo de pleurisia em camundongos. Assim, a administração do inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME, inibiu o extravasamento plasmático e quase completamente a migração de neutrófilos para a cavidade pleural após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Além disso, o seu isômero inativo, a D-NAME, não alterou a resposta inflamatória induzida pelo agonista seletivo B<sub>1</sub>.

A dosagem de nitrato no exsudato plasmático dos animais que receberam injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, revelou um aumento dos níveis de nitrito. Analisados em conjunto esses resultados mostram claramente que o NO exerce um papel importante na modulação da resposta inflamatória induzida pelo agonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> das cininas no modelo de pleurisia em camundongos.

O tratamento com inibidores da óxido nítrico sintase reduz o grau de inflamação aguda ou de artrite em ratos, enquanto a administração de L-arginina foi capaz de reverter esta resposta (Ialenti et al., 1992).

Nossos resultados confirmam dados da literatura com relação a ação inflamatória do NO, embora vários estudos indiquem também uma atividade antiinflamatória para este radical livre (Hickey et al., 1997). Tem sido também demonstrado que inibidores da óxido nítrico sintase podem prevenir a quimiotaxia e a degranulação de neutrófilos (Belenky et al; 1993; Wyatt et al., 1993). Por outro lado, é conhecido o efeito do NO em inibir as enzimas NADPH oxidase e 5-lipoxigenase, as quais são responsáveis pela produção de ânion superóxido e de LTB<sub>4</sub>, respectivamente. Estes dois agentes possuem conhecida atividade quimiotática para os neutrófilos (Moilanen et al., 1995). Deste modo, nossos resultados estão de acordo com o efeito pró- inflamatório descrito para o NO na literatura.

A resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongo foi, surpreendentemente, potencializada com o tratamento dos animais com indometacina, ao contrário do que já foi relatado para o edema de pata induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em ratos tratados previamente com LPS (Campos et al., 1996), com BCG (Campos et al.,

1997) ou após a desensibilização com injeções repetidas de agonista B<sub>2</sub> (Campos & Calixto, 1995). É descrito na literatura que as prostaglandinas exercem uma atividade moduladora em diversas funções dos neutrófilos que contribuem para o processo inflamatório. Por exemplo, as prostaglandinas podem inibir a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, inibindo a migração destas células para o sítio inflamatório (Granger et al., 1994; Asako et al., 1992). As prostaglandinas também suprimem a produção de ânion superóxido e a liberação de mediadores inflamatórios como LTB<sub>4</sub> e IL-8 (Kainoh et al., 1990; Wertheim et al., 1993). Recentemente, Moraes et al. (1996) relataram que a aspirina e a indometacina, dois inibidores das ciclooxigenases, aumentaram significativamente a infiltração de neutrófilos para dentro dos pulmões, após a administração de LPS por via inalatória em camundongos. Este efeito foi associado com aumento da produção de TNF- $\alpha$  e supressão da produção de prostaglandina E<sub>2</sub>. A estimulação de células mononucleares residentes da cavidade pleural de ratos com LPS, *in vitro*, mostrou que a presença de PGE<sub>2</sub> exógena reduziu a produção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  de maneira dose-dependente (Utsunomiya et al., 1993). Do mesmo modo, com base no efeito modulatório exercido pelas prostaglandinas sobre as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , nossos resultados

também poderiam ser assim explicados. Estas citocinas possuem reconhecida atividade quimiotática para neutrófilos (Sayers et al., 1988; Mason et al., 1989; Ahluwlia et al., 1996), e podem estar sendo liberadas de macrófagos residentes da cavidade pleural por ativação de receptores  $B_1$ , presentes na superfície destas células, após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Estudos adicionais são necessários para elucidar este resultado, porém já foi bem demonstrado que a des-Arg<sup>9</sup>-BK é capaz de estimular a liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de macrófagos, sendo esse efeito mediado pelo receptor  $B_1$  presente na superfície destas células (Tiffany e Burch, 1989; Burch et al., 1989). Além disso, estes dados foram complementados pelos experimentos de *binding* em macrófagos murinos RAW264.7 utilizando [<sup>3</sup>H] Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, um outro agonista seletivo para o receptor  $B_1$  radioativamente marcado, demonstrando assim a presença constitutiva destes receptores na superfície da membrana celular em macrófagos (Burch et al., 1992; Burch e Kyle, 1992). Outra hipótese para explicar a diferença de respostas da indometacina poderia estar associada, pelo menos em parte, com a diferença entre os mecanismos de ação da des-Arg<sup>9</sup>-BK em receptor  $B_1$  constitutivo, caracterizado no modelo de pleurisia

em camundongos, e as respostas observadas em modelos onde os receptores  $B_1$  foram induzidos por trauma ou decorrente de processos inflamatórios.

Por outro lado, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento dos animais com terfenadina, em uma dose que tem sido mostrada ser capaz de inibir as ações inflamatórias da histamina (1 nmol por cavidade) (resultados não mostrados), não foi capaz de interferir com a resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, sugerindo assim que a histamina não está envolvida nesta resposta. Esses resultados são importantes uma vez que existem vários relatos mostrando que as cininas são capazes de liberar histamina de mastócitos (Devillier et al., 1985; De Campos et al., 1996; para revisão ver: Hall., 1992). Entretanto, Bueb et al.(1993), demonstraram que o produto resultante da remoção do resíduo carregado positivamente, a Arg, por N-acetilação da molécula da BK, é capaz de diminuir de forma significativa a secreção de histamina pelos mastócitos.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que o agonista seletivo do receptor  $B_1$  des-Arg<sup>9</sup>-BK, quando injetado por via i.t. em camundongos, produz uma intensa resposta inflamatória caracterizada por exsudação e migração de neutrófilos. A resposta inflamatória causada

pela des-Arg<sup>9</sup>-BK é mediada por estimulação de receptores B<sub>1</sub> constitutivos, além de ser em grande parte mediada pela liberação de neuropeptídeos de fibras nervosas sensoriais, como a substância P, que por sua vez atuam por ativação de receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e parcialmente nos receptores NK<sub>3</sub>, além de liberar CGRP. Além disso, ficou bem demonstrada também a participação do NO na resposta inflamatória induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK no modelo murino de pleurisia. Por outro lado, as ações inflamatórias causadas pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK parecem envolver também os metabólitos derivados do ácido araquidônico através da via da cyclooxygenase. Por outro lado, não foi constatado o envolvimento da histamina no processo inflamatório induzido pelo agonista seletivo B<sub>1</sub>. Em conjunto com dados descritos na literatura, estes resultados sugerem que os antagonistas seletivos para o receptor B<sub>1</sub> podem apresentar interesse clínico no tratamento de certos processos inflamatórios, especialmente no trato respiratório.

## RESUMO

1- No presente estudo foi caracterizada a participação do receptor  $B_1$  das cininas, bem como o envolvimento de alguns mediadores, na resposta inflamatória induzida pela injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

2- A injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK (10 -100 nmol por cav.), um agonista seletivo para o receptor  $B_1$ , causou um aumento significativo, tempo e dose-dependente da permeabilidade vascular observada depois de 5 min, o qual alcançou um pico após 1h da injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Este aumento do extravasamento plasmático foi acompanhado de migração de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, e em menor extensão de células mononucleares para a cavidade pleural dos animais, com um pico em 4h, e permanecendo na cavidade até 24 após a injeção do agonista. Após 12 h da indução da pleurisia ocorreu o influxo de células mononucleares, de maneira significativa e mantendo-se por mais 12 h. Contudo, 48 horas e até 72 horas após a injeção intratorácica de des-Arg<sup>9</sup>-BK, as células inflamatórias retornaram aos valores basais. O aumento

do extravasamento plasmático causado pela des-Arg<sup>9</sup>-BK retornou ao nível basal após 2 h da injeção do peptídeo. A injeção intratorácica de Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.), causou uma resposta inflamatória similar na cavidade pleural de camundongos.

3- Ambos, exsudação e influxo de neutrófilos induzidos pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, foram significativamente inibidos ( $P < 0.01$ ) pela injeção i.t. dos antagonistas seletivos para o receptor B<sub>1</sub> das cininas, seja a des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (60 e 100 nmol por cav.), ou a des-Arg<sup>9</sup>-NPC 17731 (5 nmol por cav.), administrados em associação com a des-Arg<sup>9</sup>-BK ( $P < 0.01$ ) para o pico do extravasamento plasmático (1h), e 30 ou 60 min antes do pico da migração de neutrófilos (4h), respectivamente. Por outro lado, a injeção i.t. de HOE 140 (30 nmol por cav.), um antagonista seletivo para o receptor B<sub>2</sub> das cininas, em dose capaz de antagonizar consistentemente a indução de pleurisia pela BK (10 nmol por cav.), não foi capaz de inibir a pleurisia induzida pela injeção i.t. des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos.

4- A injeção i.t. de antagonistas seletivos taquicinérgicos NK<sub>1</sub>, FK 888 (1 nmol por cav.), NK<sub>2</sub>, SR 48968 (20 nmol por cav.) ou NK<sub>3</sub>, SR 142801 (10 nmol por cav.), administrado 5 min antes da indução da pleurisia, antagonizou significativamente a migração de neutrófilos causada pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK. Além disso, o FK 888 e o SR 142801, mas não o SR 48968, também preveniram o influxo de células mononucleares induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK de maneira significativa (P < 0.01). Entretanto, o antagonista taquicinérgico NK<sub>3</sub>, o SR 142801 (10 nmol por cav.) também foi capaz de inibir significativamente o extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. A injeção i.t. do CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol por cav.), um antagonista do receptor do CGRP, quando administrado 5 min antes da indução da pleurisia, inibiu o extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK (P < 0.01), sem afetar significativamente a cinética do total ou do diferencial de células que migraram para a cavidade pleural dos animais.

5- A administração de inibidores da óxido nítrico sintase L-NOARG ou L-NAME, ambos na dose de (1 pmol por cav.), quando administrados 30 min

antes da indução da pleurisia pela des-Arg<sup>9</sup>-BK, inibiram quase que completamente a migração de neutrófilos ( $P < 0.01$ ), e em menor extensão, inibiram a migração de células mononucleares ( $P < 0.01$ ) no pico de (4h). O D-entantiômero D-NAME não causou nenhum efeito na pleurisia induzida pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Utilizando-se as mesmas doses de L-NOARG e de L-NAME, ambas foram hábeis em inibir de maneira significativa a migração total de células para a cavidade pleural dos animais ( $P < 0.01$ ). A administração de L-NAME, mas não de L-NOARG causou inibição significativa do extravasamento plasmático induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK. Os níveis de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) medidos no exsudato, aumentaramm significativamente nos períodos de 15 e 30 minutos após a injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, retornando aos valores basais após 60 minutos da indução da pleurisia.

6- A administração de indometacina ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) 1 h antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.), inibiu a migração de células mononucleares ( $P < 0.05$ ), porém, surpreendentemente aumentou a migração de neutrófilos no pico de 4 h sem interferir com o extravasamento plasmático.

7- A administração de terfenadina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.), um antagonista  $H_1$ , 30 min antes da des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol por cav.), não interferiu significativamente com a migração células inflamatórias ou com o extravasamento plasmático na pleurisia causada pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK na cavidade pleural de camundongos.

8- O tratamento prévio dos animais com lipopolissacarídeo de *E. coli*, LPS (10  $\mu\text{g}$  por animal, i.v.), 24 h antes, não resultou em nenhuma mudança na resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK quando comparado com o grupo de animais que recebeu salina. Entretanto, o mesmo tratamento prévio com LPS resultou em aumento significativo do edema de pata induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK em camundongos ( $P < 0.01$ ).

9- Em conclusão, nossos resultados demonstram que a resposta inflamatória induzida pela injeção i.t. de des-Arg<sup>9</sup>-BK, no modelo murino de pleurisia, é mediada pela ativação de receptores  $B_1$  constitutivos da cavidade pleural em camundongos. Esta resposta foi largamente mediada pela liberação de neuropeptídeos como a substância P ou o CGRP, como

também pelo NO. Entretanto, os produtos derivados da via da ciclooxigenase ou a histamina, não estão envolvidos nesta resposta. Estes resultados em conjunto, sustentam a hipótese de que o receptor  $B_1$ , presente de forma constitutiva na cavidade pleural de camundongos, participa de forma importante na modulação de processos inflamatórios, e pode contribuir para o estudo deste receptor em processos fisio-patológicos.

**A maioria destes resultados foi publicada no British Journal of Pharmacology 123: 281-291, 1998.**

## SUMMARY

1- The characterization of the B1 kinin receptor, and some mediators involved in the inflammatory response elicited by intrathoracic (i.t.) administration of des-Arg9-BK in the mouse model of pleurisy, was investigated.

2- I.t. injection of des-Arg9-BK (10 -100 nmol per site), a selective B1 agonist, caused a significant and dose-related increase in the vascular permeability observed after 5 min, which peaked at 1h, associated with an increase in polymorphonuclear cell influx, mainly neutrophils, and, to a lesser extent, mononuclear cell influx, peaking at 4 h and lasting for up to 48 h. The increase in fluid leakage caused by des-Arg9-BK was completely resolved 4 h after peptide injection. I.t. injection of Lys-des-Arg9-BK (30 nmol per site) caused similar inflammatory response.

3- Both the exudation and the polymorphonuclear neutrophil influx elicited by i.t. injection of des-Arg9-BK were significantly antagonised ( $P < 0.01$ ) by the i.t. injection of the selective B1 antagonists des-Arg9-[Leu8]-BK (60

and 100 nmol per site) or des-Arg9-NPC 17731 (5 nmol per site), administered in association with des-Arg9-BK ( $P < 0.01$ ), or 30 and 60 min before cellular peakage, respectively. In contrast, the i.t. injection of B2 bradykinin selective receptor antagonist HOE 140 (30 nmol per site), at a dose which consistently antagonised bradykinin (10 nmol per site)-induced pleurisy, had no significant effect on des-Arg9-BK-induced pleurisy.

4- The i.t. injection of the selective tachykinin receptor antagonists NK1, FK 888 (1 nmol per site), NK2, SR 48968 (20 nmol per site) or NK3, SR 142801 (10 nmol per site), administered 5 min before pleurisy induction, significantly antagonised neutrophil cell migration caused by i.t. injection of des-Arg9-BK. In addition, FK 888 and SR 142801, but not SR 48968, also prevented the influx of mononuclear cells in response to i.t. injection of des-Arg9-BK ( $P < 0.01$ ). However, the NK3 receptor antagonist SR 142801 (10 nmol per site) also significantly inhibited des-Arg9-BK-induced plasma extravasation. The i.t. injection of CGRP receptor antagonist CGRP8-37 (1 nmol per site), administered 5 min before pleurisy induction, inhibited des-Arg9-BK-induced plasma extravasation ( $P < 0.01$ ), without significantly affecting the total and differential cell migration.

5- The nitric oxide synthase inhibitors L-NOARG and L-NAME (1 pmol per site), administered 30 min beforehand, almost completely prevented des-Arg9-BK-induced neutrophil cell migration ( $P < 0.01$ ), and, to a lesser extent, mononuclear cell migration ( $P < 0.01$ ), in response to i.t. injection of des-Arg9-BK. The D enantiomer D-NAME had no effect on des-Arg9-BK-induced pleurisy. At the same dose range, L-NOARG and L-NAME inhibited the total cell migration ( $P < 0.01$ ). L-NAME, but not L-NOARG caused a significant inhibition on des-Arg9-BK-induced fluid leakage. The levels of the nitrite ( $\text{NO}^-_3$ ) measured in exsudate significantly increased after 15 and 30 min after i.t. injection of the des-Arg9-BK, and returned in basal levels after 60 min of the pleurisy induction.

6- Indomethacin (1 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), administered 1 h before des-Arg9-BK (30 nmol per site), inhibited the mononuclear cell migration ( $P < 0.05$ ), but, surprisingly, increased the neutrophils migration at 4 h without interfering with plasma extravasation.

7- The administration of terfenadine (50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 min prior to des-Arg9-BK (30 nmol per site), did not interfere significantly with the total cell migration or with the plasma extravasation in the mouse pleurisy caused by i.t. injection of des-Arg9-BK.

8- The previous treatment of animals with lipopolyssacharide of the E. coli , LPS (10 µg per animal, i.v.), 24 hours prior, did not result in any significant change of the inflammatory response induced by i.t. injection of des-Arg9-BK compared with saline treated group. However, the identical treatment of mice with LPS resulted in a marked enhancement of des-Arg9-BK induced paw oedema in mice (P<0.01).

9- In conclusion, we have demonstrated that the inflammatory response induced by i.t. injection of des-Arg9-BK, in a murine model of pleurisy, is mediated by stimulation of constitutive B1 receptors. These responses are largely mediated by release of neuropeptides such as substance P or CGRP and also by NO, but products derived from cyclo-oxygenase pathway and histamine seem not to be involved. Therefore, these results further support the notion that the B1 kinin receptor has an important role in modulating

inflammatory responses, and may contribute for study this is receptor in fisio-pathologicals process.

**Most of these results have been published in British Journal of Pharmacology 123: 281-291, 1998.**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADVENIER, C., NALINE, E., TOTY, L., BAKDACH, H., EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., BRELIÈRE, J.C., LE FUR, G. Effects on the isolated human bronchus of SR 48968, a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptors. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 146: 1177-1181, 1992.

ADVENIER, C., LAGENTE, V. BOICHOT, E. Boichot, E.. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. **Eur. Respir. J.**, 10:1892-1906, 1997.

ANSEL, J.C., BROWN, J.R. PAYAN, D.G. BROWN, M. A. Substance P selectively activates TNF- $\alpha$  gene expression in murine mast cells. **J. Immunol.** 150:, 4478-4485, 1993.

ASAKO, H., KUBES, P. T., WALLACE, J.L. GAGINELLA, T. WOLF, R.E., GRANGER, D.N. Indomethacin induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxigenase products. **Am. J. Physiol.** 262: 903-908, 1992.

AUDET, R.; PETICLERC, E., DRAPEAU, G., RIOUX, F. E MARCEAU, F. Further analysis of the upregulation of bradykinin B<sub>1</sub> receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.** 271, 551-555, 1994.

BALUK, P., BERTRAND, C., GEPETTI, P., D.M., McDONALD, e NADEL, **Am. J. Physiol.**, 268: L223, 1995.

BARNES, P.J., CHUNG, K.F. & PAGE, C.P. Inflammatory mediators and asthma. **Pharmacol. Rev.**, 40, 49-84, 1988.

BARNES, P.J. Bradykinin and asthma. **Thorax.**, 47, 979-983, 1992.

BATHON, J.M., MANNING, D.C., GOLDMAN, D.W., TOWNS, M.C. & PROUD, D. Regulation of kinin in human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. **J.Pharmacol. Exp. Ther.**, 260, 384-392, 1992.

BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Annu Rev. Pharmacol.**, 31: 129-162, 1991.

BAYLIS, S.A., WEINER, C.P., MONCADA, S. e CHARLES, I.G. *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in the human fetus (abstract 3). Presented at the **First International Conference on Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide**, Los Angeles, California, pp.66, 1994.

BEAUBIEN, G.; ROSINSKI-CHUPIN, I.; MATTEI, M.G.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M; SEIDAH, N.G. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochemistry**, 30: 1628-1635, 1991.

BELENKY, S.N., ROBBINS, R.A., RENNARD, S.I., GOSSMAN, G.L., NELSON, K.J., RUBINSTEIN, I.. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. **J. Lab. Clin. Med.**, 122, 388-394, 1993.

BERTRAND, C. & GEPETTI, P. Tachykinin and kinin receptor antagonists: therapeutic perspectives in allergic airway disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, 17, 255-259, 1996.

BHoola, K.D., FIGUEROA, C.D. & WORTHY, K. Biorregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44, 1-80, 1992.

BOUTHILLIER, J. DEBLOIS, D. E MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** 92, 257-264, 1987.

- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin-gene related peptide and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, 86: 855-860, 1985.
- BUEB, J.L.; MOUSLI, M., LANDRY, Y, REGOLI, D. Structure-activity studies of bradykinin analogues on rat mast cell histamine release. **Peptides** 14, 685-689, 1993.
- BOZIC, C.R., LU, B. HÖPKEN, U.T., GERARD, N.P. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. **Science**. 273, 1722-1725, 1996.
- BURCH, R.M.; DEHAAS, C.J. A bradykinin antagonist inhibits carragenin oedema in rats. **Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 342: 189-193, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J.; STORMANN, T.M. **Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors**, ed by Burch RM, pp. 107, Austin, R.G. Landes Co, 1993.

CABRINI, D.A., KYLE, D.J., CALIXTO, J.B. A pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277, 299-307, 1996.

CAHILL, M., FISHMAN, J.B. & POLGAR, P. Effect of des-Arg<sup>9</sup>-BK and other bradykinin fragments on the synthesis of prostacyclin and the binding by vascular cells in culture. **Agents Actions**, 24, 224-231, 1988.

CALIXTO, J. B., MEDEIROS, Y.S. Bradykinin-induced biphasic response in rat isolated stomach fundus: functional evidence for novel bradykinin receptor . **Life Sci.** 50: 47-52, 1992.

CAMPOS, M.M., MATA, L.V., CALIXTO, J.B. Expression of B<sub>1</sub> kinin receptors mediating paw oedema and Formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 73, 812-819, 1995a.

CAMPOS, M.M. E CALIXTO, J.B. Involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.** 114: 1005-1013, 1995b.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P. & CALIXTO, J.B. Upregulation of B<sub>1</sub> mediating des-Arg<sup>9</sup>-Bk-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxina. **Br. J. Pharmacol.**, 117,793-798, 1996.

CAMPOS, M.M., HENRIQUES, M.G.M.O. & CALIXTO, J.B. The role of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in oedema formation after long-term infection with *Mycobacterium bovis* BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG). **Br. J. Pharmacol.**, 119,502-50, 1997.

CARRETERO, O.A., CARBINI, L.A. E SCICLI, A.G. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: General description, nomenclature and the mouse gene family. **J. Hypertens.** 11, 693-697, 1993.

CLINTON, S.K., FLEET, J.C. LOPPNOW, H., SALOMON, R.N., CLARK, B.D., CANNON, J.G., SHAW, A . E LIBBY, P. Interleukin-1 gene

expression in rabbit vascular tissue *in vivo*. **Am. J. Pathol.** 138, 1005-1014, 1991.

CORRÊA, C.R. & CALIXTO J.B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110, 193-198, 1993.

CRUWYS, S.C.; GARRET, N.E.; PERKINS, N.M.; BLAKE, D.R.; KIDD, B.L. The role of bradykinin B<sub>1</sub> receptor in the maintenance of intraarticular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 940-944, 1994.

DAMOULIS, P.D., HAUSCHKA, P.V. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 201:924-931, 1994.

DAVIS, A.J., AND PERKINS, M.N. Induction of B<sub>1</sub> receptors "*in vivo*" in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacol.**, 33, 127-133, 1994a.

DAVIS, A.J., AND PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 113,63-68, 1994b.

DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. & MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factor on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, 93, 969-977, 1988.

DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. & MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin *in vivo* and *in vitro*. **Immunopharmacology** 17, 187-198, 1989.

DEBLOIS, D., BOUTHILLIER, J. & MARCEAU, F. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances tissue response to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin: possible role of interleukin-1. **Br. J. Pharmacol.**, 103, 314-415, 1991.

DENG, W., THIEL, B. TANNENBAUM, C. S., HAMILTON, T.A., STUERH, D.J. Synergic cooperation between T cell Lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.** 151: 322-329, 1993.

DINERMAN, J.L., DAWSON, T.M., SCHELL, M.J. SNOWMAN, A. e SNYDER, S.H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 4214-4218, 1994.

D'ORLEANS-JUSTE, P., NUCCI, G., VANE, J.R. Kinins act on B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 96: 920-926, 1989.

DRAPEAU, G. DEBLOIS, D. E MARCEAU, F. Hypotensive effects of Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and metabolically protected agonists of B<sub>1</sub> receptors for kinins. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 259: 192-1991.

DRAY, A. & PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosci.**, 16, 99-104, 1993.

ELLIOT, D.F., HORTON, E.W. e LEWIS, G.P. Actios of pure bradykinin. **J. Physiol.** 153, 473-480, 1960.

EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D. ADVENIER, C., NALINE, G., NELIAT, G., LE FUR, G., BRELIERE, J.C. 1.A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor. **Life Sciences**, 50, 101-106, 1992.

EMONDS-ALT, X., BICHON, D., DUCOUX, J.P., HEAULME, M., MILOUX, B., PONCELET, M., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., VILAIN, P., NELIAT, G., SOUBRIER, P., LE FUR, G., BRELIERE, J.C. SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor. **Life Sci. Pharmacol. Lett**, 56, 127-132, 1995.

ERDÖS, E.G. Kininases, In : **Bradykinin, kallidin and kallikrein.**,

Handbook of Experimental Pharmacology, ed. by E.G. ERDÖS, pp.427-487. Springer-Verlag, Berlin, 1979.

ESCOTT, K.J. & BRAIN, S.D.. Effect of calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP<sub>8-37</sub>) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve. **Br. J. Pharmacol.**, 110, 772-776, 1993

FARMER, S.G., BURCH, R.M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 32, 511-532, 1992.

FORSTERMANN, U. POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H.H.W., HELLER, M. E.MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derive relaxing factor nitric oxide synthesase activity is present in the particulate and cytosolic fractiosn of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 1788-1792, 1991.

FUJII, T., MURAI, M., MORIMOTO, H., MAEDA, Y., YAMAOKA, M., HAGIWARA, D., MIYAKE, H. IKARI, N., MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK 888. **Br. J. Pharmacol.**, 107, 785-789, 1992.

FURCHGOTT, R.F.: Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is norganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: **Vasodilatation:Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium**, ed. by P. M. Vanhoute, 401-414, Raven Press, New York, 1988.

FURCHGOTT, R.F.: Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. **Acta. Physiol. Scand.** 139: 257-270, 1990.

FURUTO-KATO, S. MATSUMOTO, A ., KITAMURA, N. AND NAKANISHI, S. Primary structures of the mRNAs encoding the rat

precursors for bradykinin and **T-kinin**. **J. Biol. Chem.** 260, 12054-12059, 1985.

GALLIZI, J.P., BODINIER, M.C., CHAPELAIN, B., LY, S.M., COUSSY, L., GIRAUD, S., NEILAT, G. & JEAN, T. Up-regulation of [<sup>3</sup>H]-des-Arg<sup>10</sup>-kallidin binding to the bradykinin B<sub>1</sub> receptor by interleukin-1 $\beta$  in isolated smooth muscle cells: correlation with B<sub>1</sub> agonist-induced PGI<sub>2</sub> production. **Br. J. Pharmacol.**, 113, 389-394, 1994.

GERARD, H.P., BAO, L. PING, H.X. & GERARD, C. Molecular aspects of the tachykinin. **Regul. Pept.** 43: 21-35, 1993.

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

GEPPETTI, P., BERTRAND, C., RICCIARDOLO, M.L., NADEL, J. A. . New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. **Can. J. Pharmacol.**, 73, 843-847, 1995.

GONÇALVES, V.L., VARGAFTIG, B.B., LEFORT, J. MEAGER, A. e CHIGNARD, M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysacárideo-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **Br. J. Pharmacol.**, 117, 1792-1796, 1996.

GRANGER, D.N., KUBES, P., The microcirculation and inflammation: modulation of leucocyte-endothelial cells adhesion. **J. Leucocyte Biol.**, 55: 662-675, 1994.

GRANGER, N., e KUBES, P. Nitric Oxide as Antiinflamamatory Agent. In: **Methods in Enzimology**, 269: 435-442, 1996.

HALL, J.M. Bradykinin receptors, pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, 56, 131-190, 1992.

HALL, J.M.. Bradykinin Receptors . In: **Gen. Pharmac.**, 28, nº 1, 1-6, 1997.

HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., YOUNG, G.S., STRADER, C.D. & RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterisation of a human bradykinin B<sub>2</sub> receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 184, 260-268, 1992.

HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A. & MACNEIL, T., STONESIFER, G.Y., FRAHER, J., STRADER, C.D. & RANSOM, R.W. Differential pharmacology of cloned human and mouse B<sub>2</sub> bradykinin receptors. **Mol. Pharmacol.**, 45, 1-8, 1994.

HESS, J.F., DERRICK, A.W., McNEIL, T., BORKOWSKI, J.A.. The agonist selectivity of a mouse B-1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B-1 receptors. **Immunopharmacol.**, 33, 1-3, 1-8, 1996.

HIBBS, J.B.J., Jr., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z., GRANGER, D.L., DRAPIER, J.-C, AMBER, I.J., e LANCASTER, J.R., Jr. Syhthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracelular iron. In: **Nitric oxide from L-arginine: A Bioregulatory**

**System**, ed. by Moncada S. e Hibbs, 189-223, Elsevier, Amsterdam, 1990.

HICKEY, J. M. KEITH, A., SHARKEY, K.E., SIHOTA, E.G., REINHARDT, P.H., MACMICKING, J.D., NATHAN, C. e KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficiente mice have enhanced leucocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.*, 955-964, 1997.)

IALENTI, A., MONCADA, S., E Di ROSA, M., Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxid. **Br. J. Pharmacol.**, 110, 701-706, 1993.

ICHINOSE, M. e BARNES, P.J.. Bradykinin-induced airway microvascular leakage and broncoconstriction are mediated via a bradykinin B<sub>2</sub> receptor. **Am. Rev. Respir. Dis.** 142, 1104-1107, 1990.

IGNARRO, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Ann. Rew. Pharmacol. Toxicol.** 30: 535-560, 1990.

IGNARRO, L.J. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. **Blood Vessels**. 28: 67-73, 1991.

ISSANDOU, M. E DARDON, J. M. Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin modulates DNA synthesis, phospholipase C, and protein kinase C in cultured mesangial cells. **J. Biol. Chem.** 266: 21037-21043, 1991.

JANCSO, N., KYRALI, E. e JANCSO-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, 270, 741-743, 1977.

KAINOH, M., AMAI, R. UMETSU, T. HATTORI, M. NISHIO, S. Prostacyclin and beraprost sodium as suppressors of activated rat polymorphonuclear leucocytes. **Biochem. Pharmacol.** 39: 477-484, 1990.

KAMIKAWA, Y. & SHIMO, Y.. SR 48968, a novel non-peptide tachykinin NK<sub>2</sub>-receptor antagonist selectively inhibits the non-cholinergically

mediated neurogenic contraction of guinea pig isolated bronchial muscle.

**J. Pharm. Pharmacol.**, 45, 1037-1041, 1993.

KHALIL, Z. & HELME, R.D.. The quantitative contribution of nitric oxide and sensory nerves to bradykinin-induced inflammation in rat skin microvasculature. **Brain Res.**, 589, 102-108, 1992.

KOBZIK, L., BREDT, D.S., LOWENSTEIN, C.J. DRAZEN, J. GASTON, B. SUGAR-BAKER, D. e STAMLER, J.S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 9: 371-377, 1993.

KOBZIK, L., REID, M. B., BREDT, D.S. e STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature (Lond)** 372: 546-548, 1994.

KOWALSKI, M.L., SLIWINSKI-KOWALSKA, M e KALINER, M. Neurogenic inflammation, vascular permeability and mast cells. II Additional evidence indicating that mast cells are not involved in neurogenic inflammation. **J. Immun.** 145: 1214-1221, 1990.

LEMBECK, F., DONNERER, J. TSUCHIYA, M. e NAGAHISA, A. The non peptide tachykinin antagonist, CP 96345, is a potent inhibitor of neurogenic inflamatio. **Br. J. Pharmacol.** 105: 527-530, 1992.

LERNER, U.H., & MODEER, T. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor agonists synergistically potentiate interleukin-1-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. **Inflammation**, 15, 427-436, 1991.

LERNER, U.H., BRUNIUS, G. & MODEER, T. On the signal transducing mechanisms involved in the synergistic interaction between interleukin-1 and bradykinin in prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. **Biosc. Reports.** 12, 263-271, 1992.

LEVESQUE, L., HARVEY, N., RIOUX, F., DRAPEAU, G, MARCEAU, F. Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins. **Immunopharmacology** , 29: 141-147, 1995.

LOWMAN, M.A., BENYON, R.C. & CHURCH, M.K. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. **Br. J. Pharmacol.** 95: 121, 1988.

LUNDBERG, J.M., FRANCO-CERECEDA, A., HUA, X., HÖKFELT, T., FISCHER, J.A. Co-existence of substance P and Calcitonin gene-related peptide like-immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. **Eur. J. Pharmacol.** 108: 315-319, 1985.

MA, J., WANG, D., WARD, D.C., CHEN, L., DESSAI, T., CHAO, J. AND CHAO, L. Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B<sub>2</sub> receptor. **Genomics**, 23, 362-369, 1994.

MAAS, J., RAE, A.G., HUIDOBRO-TORO, J. & CALIXTO, J.B.. Characterisation of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, 114, 1471-1477, 1995.

MAGGI, A .C. Tachykinin and Calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves.

**Progress in Neurobiol.**, 45: 1-88, 1995.

MANTIONE, C.R., RODRIGUES, F. A bradykinin (BK)<sub>1</sub> receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice..**Br J**

**Pharmacol.** 99 (3): 516-518. 1990 .

MARCEAU, F. & REGOLI, D.. Kinin receptors of the B<sub>1</sub> type and their antagonists. In: **Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research**, ed by Burch RM, pp. 33-49, New York, Marcel Dekker, 1991.

MARCEAU, F. Kinin B<sub>1</sub> receptors: a review. **Immunopharmacology**, 30, 1-26, 1995.

MARCEAU, F., LARRIVEE, J.F., SAINT-JACQUES, E., BACHVAROV, D.R. The kinin B<sub>1</sub> receptor: an inducible G protein coupled receptor. an **J. Physiol Pharmacol**, 75 (6): 725-730, 1997.

McEACHERN, A.E., SHELTON, E.R., BHAJTA, S., OBERNOLT, R., BACH, C., ZUPPAN, P., FUJISAKI, J., ALDRISH, R.W. & JARNAGIN, K. Expression cloning of rat B<sub>2</sub> bradykinin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 88, 7724-7728, 1991.

McDONALD, D.R.<sup>a</sup> MITCHELI, G.GABELLA E A . HASKELL Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. **J. Neurocytol.** 17: 605-628, 1988.

MATSUDA, H., KAWAKITA, K., KISO, Y., NAKANO, T. e KITAMURA, Y. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. **J. Immun.** 142: 927-931, 1989.

MENKE, J.G., BOROWSKI, J.A., BIERILKO, K.K., MAcNEIL, T., DERRIC., A.W., SCHENEK, K.A., RANSOM, R., W., M., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L. & HESS, J.F.. Expression of cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269, 21583-21586, 1994.

MOHAUPT, M.G., ELZIE, J.L., AHN, K.Y., CLAPP, W.L., WILCOX, C.S.

e KONE, B.C. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthase in rat kidney. **Kidney Int.** 46: 653-665, 1994.

MOILANEN, E. e VAPAATALO, H. Nitric Oxide in Inflammation and

Immune Response. In: Special Section: Nitric Oxide in Medicine, **Annals of Medicine**, 27: 359-367, 1995.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E. A. : Biosynthesis of nitric

oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.** 38: 1709-1715, 1989.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J. E HIGGS, E.A. Nitric Oxide:

Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews.** 43:112-142, 1991.

MONCADA, S. E HIGGS, E. A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. **N.**

**Engl. J. Med.** 329: 2002-2012, 1993.

MONCADA, S., HIGGS, E.A. e FURCHGOTT, R. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research<sup>a</sup> , **Pharmacological Reviews**, 49:137-142, 1997.

MOUSSAOUI, S.M., PHIKIPPE, L., LE PRADO, N. e GARRET, C. **Eur. J. Pharmacol.** , 238: 421, 1993.

MORAES, V.L.G., VARGAFTIG, B., LEFORT, J., MEAGER, A. & CHIGNARD M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. **Br. J. Pharmacol.**, 117, 1792-1796, 1996.

MURAD, F., ISHII, K., FÖRSTERMANN, U., GORSKI, L. KERWIN, J.F. Jr. POLLOCK, J. E HELLER, M. EDRF is na intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.** 24: 441-448, 1990.

MURAI, M., MAEDA, Y., YAMAOKA, M. HAGIWARA, D., MIYAKE, H. MATSUO, M. FUJII, T. The pharmacological properties of FK 888, a novel dipeptide NK<sub>1</sub> antagonist. **Reg. Pept.** 64: 335-337, 1993.

MURRAY, S.R., CHAO, J., LIN, F., CHAO, L. Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S7-S15, 1990.

NAKAMURA, A., FUKITA, M. & SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 117, 407-412, 1996.

OSHIMA, G.; HIRAGA, Y.; SHIRONO, K.; OH-ISHI, S.; SAKAKIBARA, S.; KINOSHITA, T. Cleavage of des-Arg<sup>9</sup>-BK by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex. **Experientia**, 41: 325-328, 1985.

PAIVA, A .C. M., PAIVA, T.B., PEREIRA, C. SHIMUTA, S.I. Selectivity of bradykinin analogues for receptors mediating contraction and relaxation in rat duodenum. **Br.J. Pharmacol.** 98: 206-210, 1989.

PALMER, R.M., HICKERY, M.S. CHARLES, I.G., MONCADA, S., BAYLISS, M.T. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 193: 398-405, 1993.

PERKINS, M.N & KELLY, D. Induction of bradykinin-B<sub>1</sub> receptors “*in vivo*” in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 110, 1441-1444, 1993.

PERKINS, M.N., KELLY, D., DAVIS, A.J. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 73, 832-836, 1995.

PESQUERO, J.B., PESQUERO, J.L., OLIVEIRA, S.M. ROSCHER, A.A., METZGER, R., GANTEN, D. & BADER M. Molecular cloning and

- functional characterisation of a mouse bradykinin B<sub>1</sub> receptor gene. **Biochem. Biophys.**, 220, 219-225, 1996.
- PHILLIPS, E., CONDER, M.J., BEVAN, S., McINTYRE, P. E WEBB, M.  
Expression of functional bradykinin receptors in *Xenopus oocytes*. **J. Neurochem.** 58, 243-249., 1992.
- PROBST, W. C., SNYDER, L.A ., SCHUSTER, D.I., BROSIUS, J. E  
SEALFON, S.C.: Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. **Cell Biol.** 11, 1-20, 1992.
- PROUD, D.; KAPLAN, A.P. Kinin formation : mechanisms and role in inflammatory disorders. **Am. Rev. Immunol.**, 6: 49-83, 1988.
- RADOMSKI, M.W. , PALMER, R.M., and MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87: 5193-5197, 1990.

RAND, M. J. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 19: 147-169, 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., & BARABÉ, J.. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32, 1-46, 1980.

REGOLI, D., JUKIC, D., GOBEIL, F. E RHALEB, N.E. Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 71: 556-567, 1993.

REGOLI, D. BOUDON, A. e FAUCHÉRE, J.L., Receptors and Antagonists for Substance P and Related Peptides. **Pharmacological Reviews** 46, No. 4, 551-599, 1994.

RITTER, J. DOKTOR, H.S. , CRAGOE, E.J. Actions of bradykinin and related peptides on rabbit coeliac artery rings. **Br. J. Pharmacol.** 96: 23-28, 1989.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by tripsin. **Am. J. Physiol.**, 156: 261-273, 1949.

SALEH, T.S.F., CALIXTO, J.B., MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, 118, 811-819, 1996.

SALEH, T.S.F., CALIXTO, J.B., MEDEIROS, Y.S. The proinflammatory action of the bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.**, 331: 43-52, 1997.

SATO, F. KOYAMA,, S., NOMURA, H., KUBO, K. SEKIGUCHI, M. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil,

monocyte, and eosinophil chemotactic activity. **Journal of Immunology**, 157, I 7: 3122-3129, 1996.

SCHENECK, K.A.; HESS, J.F.; STONESIFER, G.Y.; RANSOM, R.W.  
Bradykinin B1 receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture.  
**Euro. J. Pharmacol. Mol. Pharm. Sect.**, 266: 277-282, 1994.

SCHLEMPER, V. & CALIXTO, J.B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. **Br. J. Pharmacol.**, 111, 83-88, 1994.

SEIDAH, N.G.; LADENHEIM, R.; MBIKAY, MM., HAMELIN, J., LUTFALLA, G., ROUGEON, F.; LAZURE, C. E CHRETIEN, M. The cDNA structure of rat plasma kallikrein. **Cell Biol.** 8, 563-574, 1989.

SESSA, W.C., PRITCHARD, K., SEYEDI, N., WANG, J. e HINTZE, T.H.  
Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression.  
**Circ. Res.** 74: 349-353, 1994.

SHELHAMER, J.H., LEAVEN, S.J. WU, T., JACOBY, D.B., KALINER, M. A ., RENNARD, S.I. Airway inflammation. **Ann. Int. Med.** 123, 288-304, 1995.

SHIRASAKI, H., ASAKURA, K., NARITA, S.I., WATANABE, M. e KATAURA, A. The effects of NK<sub>1</sub> receptor antagonists (FK 224 e FK888) on agonist- and antigen-induced nasal microvascular leakage in guinea pigs. **Inflamm. Res.** 46: 28-31, 1997.

SMITH, C.H., BARKER, J.N., MORRIS, R.W., MacDONALD, D.M., LEE, T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J. Immunol.** 151: 3274-3282, 1993.

STERANKA, L.R.; BURCH, R.M.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; ENNA, S.J. Multiple bradykinin receptors: results of studies using a novel class of receptor antagonists. In: **Neuroreceptors and Signal Transduction**. Ed. Plenum Pubkising Corporation, 11-127, 1988.

SUNG, C.P., ARLETH, A.J., SHIKANO, K. & BERKOWITZ, B.

Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247, 8-13, 1988.

TYFFANY, C.W., BURCH, R.M.. Bradykinin stimulates tumor necrosis

factor and interleukin-1 release from macrophages, **FEBS Lett.**, 247, 189-192, 1989.

TODA, N., BIAN, K., AKIBA, T. & OKAMURA, T. Heterogeneity in

mechanisms of bradykinin action in canine isolated blood vessels. **Eur. J. Pharmacol.** 135, 321-329, 1987.

TODA, N.. Nitric oxide and the regulation of cerebral arterial tone. In:

**Nitric Oxide in the Nervous System**, ed. by S. Vincent, 207-225, Academic Press Ltda., Orlando, 1995.

TROPEA, M.M.; GUMMELT, D.; HERZIG, M.S.; LEEB-LUNDBERG,

L.M.F. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor specific stimulation of inositol

phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg<sup>9</sup>-BK and bradykinin **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 264: 930-937, 1993.

VIANNA, R.M.J. E CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg<sup>9</sup>-BK in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, 123: 281-291, 1998.

WAGNER, E.M., MITZNER, W.A. Bronchial circulatory reversal of methacholine-induced airway constriction. **J. Appl. Physiol.**, 69: 1220-1224, 1990.

WEBB, M.; McINTYRE, P.; PHILLIPS, E. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs. **J. Neurochem.** 62: 1247-1253, 1994.

WEINER, C.P., LIZASOAIN, I., BAYLIS, S.A., KNOWLES, R.G., CHARLES, I.G., e MONCADA, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 5212-5216, 1994.

WERTHEIM, W.A., KUNKEL, S.L., STANDIFORD, T.J., BURDICK, M.D., BECKER, F.S., WILKE, C.A. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E<sub>2</sub>, dexamethasone, and IL-4. **J. Immunol**, 151: 2166-2175, 1993.

WIEMER, G. & WIRTH, K. Production of cyclic GMP via activation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 262, 729-733, 1992.

WIMALAWANSA, S.J. Calcitonin Gene-Related Peptide and Its Receptors: Molecular Genetics, Physiology, Pathophysiology, and Therapeutic Potentials. **Endocrine Reviews**, 17, 533-585, 1996.

WIRTH, K. BREIPOHL, G. STECHL, J. KNOLLE, J., HENKE, S. E SCHÖLKENS, B. Des-Arg<sup>9</sup>-Darg[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,DTic,Oic<sup>8</sup>]-bradykinin (des-Ar<sup>10</sup>-[Hoe 140] is a potent bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.** 205, 217-218, 1991.

YANO, H., WERSHIL, B.K. ARIZONO, N. GALLI, S.J. Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. **J. Clin. Invest.** 84: 127-866, 1989.

WYATT, T.A., LINCOLN, T.M., PRYZWANSKY, K.B. Regulation of human neutrophil degranulation by LY-83583 and arginine: role of cGMP-dependent protein kinase. **Am. J. Physiol.**, 265, 201-211, 1993