

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS

PABLO TORTATO WALTRICK

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ DAS CININAS NO
EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA BRADICININA E
desArg⁹-BRADICININA NA DURA-MÁTER DE RATOS**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau

Florianópolis

2004

PABLO TORTATO WALTRICK

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ DAS CININAS NO
EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA BRADICININA E
desArg⁹-BRADICININA NA DURA-MÁTER DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau

Florianópolis

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

WALTRICK, Pablo Tortato. **Envolvimento dos receptores B₁ e B₂ das cininas no extravasamento plasmático induzido pela bradicinina e desArg⁹-bradicinina na dura-máter de ratos.** Florianópolis, 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Curso de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Nicolau

Defesa: 13/02/2004

Envolvimento dos receptores B₁ e B₂ das cininas no extravasamento plasmático (EP) induzido pela bradicinina (BK) e desArg⁹-bradicinina (DABK) na dura-máter (DM) de ratos. Os resultados mostraram que a BK e DABK aumentam o EP na DM de ratos, mas não aumentaram no cerebelo e no córtex. Esta verificação foi possível graças à utilização de antagonistas seletivos de receptores B₁ e B₂, [Leu]⁸desArg⁹-BK e HOE 140, respectivamente. A administração de LPS provoca o aumento no EP na DM. Entretanto, não foi observada indução de receptores B₁ nos animais pré-tratados com esta toxina e injetados com o agonista B₁, sugerindo que o efeito da DABK foi independente do pré-tratamento com LPS.

Além disso, a administração da BK pode mediar a liberação de SP, através da utilização do antagonista seletivo de receptores NK₁, o RP 67580. Sugerindo que a BK pode aumentar o EP na DM tanto pela ativação direta dos receptores B₂, quanto pela estimulação de neurônios sensoriais que liberam SP. O pré-tratamento L-NAME, não alterou o EP induzido pelos agonistas de receptores B₁ e B₂ na DM de ratos. Mostrando que neste estudo do EP na DM parece não estar havendo participação direta do NO. O captopril (CAP) induziu um aumento no EP na DM de ratos, porém em animais pré-tratados com CAP e que em seguida foi administrada a BK, não foi verificada alteração significativa no EP na DM, quando comparado ao grupo tratado com BK.

Seria necessária a realização de mais estudos, para verificação de uma possível estimulação da liberação de SP, por parte da DABK, como ficou demonstrado no grupo tratado com BK e inibido com o RP 67580. Além disso, verificou-se a necessidade de mais grupos experimentais com animais pré-tratados com LPS em associação a diferentes doses de DABK, para verificar um possível aumento na expressão de receptores B₁, por parte do LPS.

E em experimentos futuros seria interessante a realização de estudos de biologia molecular para caracterização da expressão dos receptores B₁ na dura-máter de ratos, através da utilização de técnicas como o PCR.

Palavras Chave: bradicinina, desArg⁹-bradicinina, receptores B₁ e B₂, dura-máter, extravasamento plasmático, inflamação.

Dedico este trabalho ao meu maior amigo, vô Júlio Tortato, que deve estar “correndo” uma carreira no céu. Aqui tem só uma parcela de tudo que você sempre desejou. Saudade...

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mauro Nicolau, pela orientação, pelo profissionalismo, pelo estímulo na realização deste trabalho e, sobretudo pela paciência.

Ao professor Nelson Horácio Gabilan, pelo apoio dedicado, pela compreensão e co-orientação.

Aos professores Adair Roberto Soares dos Santos e Alcir Luiz Dafré, por fazerem parte da banca examinadora de defesa desta dissertação e por toda discussão que me levou a melhorar o desfecho final da mesma.

A todos os professores do Mestrado em Neurociências, pelos ensinamentos, conversas e bons momentos vividos durante toda nossa formação.

Ao amigo de toda hora Adriano Sousa, pelo companheirismo, dedicação, amizade, paciência, e auxílio em todas as horas. Valeu “mano velho”.

À minha esposa Patrícia Batista, por estar ao meu lado durante todos os momentos, me ajudar a planejar e escrever, pelo carinho, pela força e por agüentar meu mau humor. Meu muito obrigado.

À minha mãe “Joca”, por me dar força pra começar, entender minha ausência, acalmar minha angústia e me fazer ir até o fim. Ta feito “gordinha”.

Aos amigos e colegas pós-graduandos, Angélica, Ricardo, Patrícia, Douglas e Vinícius pelos bons momentos, bons papos, trocas de experiências, descontração e folias.

Aos funcionários Carlinhos, Nivaldo, Vilma, Carlos e Nivaldinho, pelos inúmeros momentos de auxílio, dedicação e simpatia.

Minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	01
1.1 Inflamação.....	01
1.2 Extravasamento Plasmático.....	03
1.3. Barreira Hematoencefálica.....	06
1.4. Bradicinina.....	09
1.4.1 Receptores da Bradicinina.....	15
1.4.1.1 O papel específico do receptor B₁ na inflamação.....	18
1.4.1.2 O papel específico de receptor B₂ na inflamação.....	21
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Estudo do extravasamento plasmático.....	27
3.2.1. Azul de Evans como marcador.....	25
3.2.2. Procedimento experimental.....	28
3.3. Grupos experimentais.....	30
3.3.1. Efeito da bradicinina (BK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos e da administração de antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ sobre este extravasamento plasmático.....	30
3.3.2. Efeito da desArg⁹-BK (DABK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos e da administração de antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ sobre este extravasamento plasmático.....	31

3.3.3. Efeito da administração do antagonista de receptores NK ₁ sobre o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	31
3.3.4. Efeito da administração de um inibidor de NO sintase sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK e no extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	32
3.3.5. Efeito do captopril (CAP) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	32
3.3.6. Efeito do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	33
3.4. Análise Estatística.....	33
3.5. Drogas.....	34
3.6. Equipamentos.....	34
4. Resultados.....	35
4.1. Efeito da bradicinina (BK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de rato.....	35
4.1.1. Efeito de antagonistas e receptores B ₁ e B ₂ sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK.....	38
4.2. Efeito da desArg ⁹ -BK (DABK) no extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	42
4.2.1. Efeito de antagonistas B ₁ e B ₂ sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK	45
4.2.2. Efeito do LPS sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	49
4.3. Efeito do captopril (CAP) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	54

4.4. Efeito do antagonista de receptores NK₁ (RP 67580) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	57
4.5. Efeito de um inibidor de NO sintase (L-NAME) sobre o extravasamento plasmático induzido por agonistas de receptores B₁ e B₂ na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.....	60
5. Discussão.....	64
6. Referências Bibliográficas.....	84

Resumo

Neste trabalho procurou-se avaliar a participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas no extravasamento plasmático (EP) na dura-máter (DM), cerebelo e córtex de ratos. A avaliação do EP foi feita pela técnica do corante azul de Evans, determinado por espectrofotometria (620 nm) e expresso em µg de azul de Evans/g de tecido seco. A administração (i.v.) de Bradicinina (BK), agonista B₂, aumentou o EP na DM de ratos, sendo este efeito bloqueado pelo antagonista seletivo de receptores B₂, HOE 140. A administração do agonista B₁, desArg⁹-BK (DABK), em ratos normais, aumentou o EP na DM e o pré-tratamento com um antagonista B₁ ([Leu]⁸desArg⁹-BK) inibiu esta resposta. O uso de antagonistas dos receptores B₂ e B₁ permitiu identificar a participação destes receptores mediando o EP na DM. Por outro lado, não observou-se modificações no EP basal no cerebelo e córtex, com a injeção dos agonistas B₁ e B₂. O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) administrado isoladamente aumentou o EP na DM de ratos. A administração de captopril (CAP) em ratos induziu o aumento do EP na DM, mas também não alterou o EP nos demais tecidos estudados. Já, o pré-tratamento com CAP, 10 minutos antes da administração de BK, não aumentou o EP induzido pela BK na DM. O pré-tratamento com o antagonista de receptor NK1, RP 67580, reduziu o EP induzido pela BK na DM. O pré-tratamento com L-NAME, 10 minutos antes de DABK e de BK, não alterou EP na DM em nenhum dos grupos.

Abstract

This work evaluated the participation of B₂ and B₁ kinin receptors on plasma extravasation (PE) in rat tissues (dura matter (DM), cerebellum and cortex). Plasma extravasation was assessed by the Evans blue dye method, determined by spectrophotometry (620 nm) and expressed in µg of Evans blue/g of dry tissue. The administration of bradykinin (BK) i.v., a B₂ receptor agonist, increased the PE in DM in rats and this effect was prevented by B₂ receptor selective antagonist, HOE 140. The B₁ receptor agonist ,desArg⁹-BK (DABK), administration in normal rats increased the PE in DM and the pre-treatment with B₁ receptor antagonist ([Leu]⁸desArg⁹-BK) inhibited this effect. B₁ and B₂ receptors antagonists agreed to indentify the PE in DM mediated by these receptors. PE basal was not enhanced in cerebellum and cortex. The Lipopolysaccharide (LPS) isolated increased the PE in DM. The isolated administration of captopril (CAP) induced the increase of PE in DM, but did not alter the PE in the others tissues analysed. Pre-treatment with CAP (10 minutes before BK), did not increase the PE induced by BK in DM. Pre-treatment with NK1 receptor antagonist, RP 67580, decreased the PE induced by BK in DM. L-NAME pre-treatment (10 minutes before DABK or BK) did not alter the PE in DM in all tissues studied.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

Um organismo que tem de lidar com a invasão de um patógeno dispõe de uma gama prodigiosa de potentes respostas defensivas, e a consequência da utilização destas respostas constitui a reação inflamatória.

A inflamação é uma resposta biológica normal à injúria tecidual, e atualmente é caracterizada pela ativação interativa de múltiplos mediadores e tipos celulares. A ativação desses diferentes componentes da resposta inflamatória resulta em aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, promovendo o movimento de células para dentro da área lesada (Bhoola, 1996). Mediadores inflamatórios específicos produzidos nos locais da lesão regulam a resposta vascular à lesão. Entre estes mediadores encontram-se moléculas vasoativas que atuam diretamente sobre o epitélio vascular para aumentar a permeabilidade vascular. Além disso, são gerados fatores quimiotáticos que recrutam leucócitos do compartimento vascular para o tecido lesado, que por sua vez secretam mais mediadores inflamatórios que ampliam ou inibem a resposta inflamatória (Rubin e Farber, 1990).

Em termos do que ocorre localmente nos tecidos, as alterações podem ser divididas em eventos vasculares e celulares. Os eventos vasculares envolvem uma dilatação inicial das pequenas arteríolas, ocasionando um aumento do fluxo sanguíneo, isto é seguido de lentificação e, depois, estase do sangue, aumento na permeabilidade das vênulas pós-capilares e exsudação de líquido. A vasodilatação é causada por diversos mediadores como, por exemplo, histamina,

prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaglandina I₂ (PGI₂). Histamina e fator de ativação plaquetária são também responsáveis pela fase inicial do aumento da permeabilidade vascular e a associação de neutrófilos às paredes das vênulas pós-capilares contribui para a fase posterior de aumento da permeabilidade vascular (Dale *et al.*, 1994).

Um componente adicional dessa resposta é a produção de dor, não somente pelo trauma direto às fibras sensitivas, mas também através da liberação de mediadores de terminais de nervos sensitivos (Bhoola, 1996).

Os mediadores químicos que são produzidos durante a inflamação são as aminas vasoativas: histamina e serotonina (5-HT); proteases do plasma: sistema complemento; sistema de cinina: Bradicinina; sistema de coagulação: Trombina e Fator Xa; metabólitos do ácido araquidônico: prostaglandinas (PG), prostaglandina E (PGE), tromboxano A₂, leucotrieno (LT); PAF – fator ativador de plaquetas; citocinas; interleucinas; quimocinas; óxido nítrico e constituintes lisossômicos dos leucócitos (ex. grânulos azurófilos e específicos dos neutrófilos).

Dentre estes mediadores inflamatórios, a bradicinina e o peptídeo intimamente relacionado calidina são peptídeos vasoativos formados pela ação de enzimas sobre substratos protéicos denominados cininogênios (Dale *et al.*, 1994).

As informações sobre esses peptídeos derivaram originalmente de duas linhas de pesquisas distintas. Werle *et al.* (1937), descreveram a calicreína, uma enzima urinária de ação sobre proteínas serínicas liberando calidina, que acarreta uma baixa da pressão arterial. Independentemente, Rocha e Silva *et al.* (1949), mostraram que certos venenos de cobra, quando incubados com soro, davam origem a uma substância hipotensora que também causava uma contração lenta

de certas preparações musculares lisas. Devido a esta ação lenta, ela foi denominada bradicinina (Dale *et al.*, 1994).

1.2. Extravasamento Plasmático

Exsudato é o líquido inflamatório extravascular rico em proteínas e detritos celulares, com alto peso molecular, o que é uma indicação de intensa alteração na permeabilidade vascular, e que causa um dos sinais cardinais da inflamação, o edema. Todos os sinais clínicos clássicos da inflamação (dor, calor, rubor), assim como o edema, são causados por alterações hemodinâmicas, alterações na permeabilidade vascular e exsudação leucocitária.

Em condições fisiológicas, o balanço dos fluídos é mantido por dois conjuntos de forças que se opõem. A pressão hidrostática que promove no leito vascular o movimento dos fluídos para fora do vaso, enquanto que em contra partida temos a pressão coloidosmótica, que é a pressão osmótica provocada pelas proteínas plasmáticas que causam o movimento dos fluídos para dentro do lúmen vascular (Gore e McDonagh, 1980).

A maior alteração na permeabilidade dos vasos durante a inflamação ocorre na microcirculação, abrangendo pequenas arteríolas, capilares e vênulas. Em situações fisiológicas normais, a transferência fluídica transcapilar é regulada segundo o equilíbrio de Starling; no terminal arteriolar do capilar, a diferença entre a pressão hidrostática intravascular e a pressão hidrostática intersticial excede a diferença entre a pressão oncótica intravascular e a pressão oncótica intersticial: o gradiente de pressão resultante dirige o fluido vascular para dentro do espaço

intersticial; como o fluido deixa o capilar, a pressão hidrostática intravascular cai e a pressão oncótica intravascular sobe, efeito da hemoconcentração. Então, no terminal venoso do capilar o fluido intersticial é sugado para dentro do vaso. Eventuais acúmulos de fluido nos tecidos retornam à corrente circulatória via sistema linfático. A pressão hidrostática circulatória é mantida pelo débito cardíaco pela vasoconstrição arteriolar. A pressão oncótica é mantida pela concentração de proteínas plasmática.

Além das pressões, hidrostática e oncótica, dos espaços intra e extravasculares, a troca de fluido também é regulada pelo endotélio, camada celular que recobre internamente os vasos sangüíneos. O forro endotelial de todas as arteríolas e vênulas e da maioria dos capilares é do tipo contínuo. Os capilares fenestrados são próprios dos órgãos endócrinos, intestinos e glomérulo renal. O endotélio, em condições fisiológicas normais, é uma barreira com permeabilidade seletiva, permitindo a livre passagem de água, íons e pequenos solutos e limitando a passagem de macromoléculas plasmáticas, entre essas a proteína plasmática albumina. Junções endoteliais parecem ser os locais nos quais a maioria das trocas de soluto e de macromoléculas ocorrem. Assim, um endotélio intacto com junções endoteliais íntegras é determinante para manter a permeabilidade vascular normal (Svensjo e Grega, 1986).

O aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente aumento do extravasamento plasmático induzido por mediadores inflamatórios se deve à dilatação das junções endoteliais; as células do endotélio possuem, em sua rede de microfilamentos, proteínas contrácteis como a actina e miosina, similares as presentes nas células musculares. A interação de mediadores inflamatórios com

seus receptores específicos na membrana de células endoteliais dispara uma cascata de eventos intracelulares que culmina na ativação de Ca^{+2} dependente das citadas proteínas contrácteis, o que provoca contração e modificação do formato celular, aumentando assim o tamanho dos poros entre as células adjacentes. O tamanho de um poro interendotelial varia de 30 a 40 Å quando as células estão relaxadas e sobe para 50 a 90 Å quando as células se contraem. No edema inflamatório ocorre perda de líquido rico em proteínas, um vazamento do endotélio, e, portanto, diminuição da pressão osmótica intravascular, associada ao aumento da pressão oncótica do interstício, o que amplifica o efeito do vazamento (Majno, 1965; Drenckhahn e Wagner, 1986; Renkin, 1986, Zhao *et al.*, 1998).

Portanto, o extravasamento de fluídos ricos em proteínas da circulação é largamente determinado por mecanismos vasculares envolvendo a separação física de células endoteliais, particularmente ao nível de vênulas pós-capilares. A vasodilatação local produzida por cininas (hiperemia inflamatória) facilita a exudação (Marceau *et al.*, 1998).

Alguns corantes como, por exemplo, o Azul de Evans podem se ligar a proteínas, e com isto podemos detectar e quantificar o extravasamento plasmático (Petersson *et al.*, 1993).

A medida do extravasamento de Azul de Evans tem sido usada para avaliar a permeabilidade do cérebro e medula em modelos animais de isquemia, trauma e hemorragia, e a espectrofotometria é uma das técnicas desenvolvidas para quantificar o extravasamento de Azul de Evans no tecido neural (Warwick *et al.*, 1995).

1.3. Barreira Hematoencefálica

Os tecidos que se interpõem entre o sangue e o sistema nervoso incluem (1) uma parede vascular, (2) uma lâmina interna e (3) outra externa de uma bainha perivascular que se encontra provavelmente em continuidade com o espaço subaracnóideo (Reese e Karnovsky, 1967).

As lâminas interna e externa da bainha perivascular fundem-se ao nível de arteríolas e vênulas. A bainha gradualmente desaparece e ao nível de capilar é substituída por uma bainha constituída por projeções dos prolongamentos dos astrócitos os quais apresentam pés terminais vasculares que revestem os capilares. As células endoteliais dos capilares formam uma camada contínua e se unem formando as junções íntimas (Ramon e Cajal, 1979). A regulação e a formação destas junções íntimas não estão totalmente elucidadas. Recentemente estudos têm demonstrado que as superfícies luminal e adluminal das células endoteliais possuem uma variedade de receptores peptídicos os quais estão ligados a segundos mensageiros intracelulares. Isto implica que a complexa transdução de sinais ocorre dentro e entre as células endoteliais que compõem uma barreira entre o sangue e o sistema nervoso (Betz, 1992).

Estas características formam o que chamamos de barreira hematoencefálica, que de modo seletivo controla a passagem de substâncias químicas do sangue circulante para o sistema nervoso central. Assim, somente compostos que apresentam apreciável solubilidade aos componentes lipídicos das células endoteliais são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica por difusão (Goldstein e Betz, 1986; Toumanem *et al.*, 1993; Bartus *et al.*, 1996).

Anatomicamente, a barreira hematoencefálica é composta por células endoteliais formando junções complexas. Comparado com as células endoteliais que formam capilares nos órgãos periféricos (não no SNC), células endoteliais cerebrais apresentam numerosos processos astrocíticos, mitocôndrias, complexos juncionais, várias fenestras, vesículas pinocíticas e especializada em sistema de transporte (Brightman, 1992). Todas essas características contribuem para a capacidade da barreira hematoencefálica de restringir a difusão de substâncias para o cérebro (Emerich *et al.*, 2001).

Portanto as funções da barreira hematoencefálica são: proteção contra agentes químicos nocivos, variações na composição sangüínea e quebra do gradiente de concentração (Petty e Lo, 2002).

As células endoteliais de artérias cerebrais e microvasos são conectadas a outras por proteínas específicas formando a barreira hematoencefálica, uma barreira mecânica para o movimento da maioria de moléculas circulantes. Muitos processos patológicos (isquemia, infecções, insultos hipertensos, hemorragia subaracnoide, etc) alteram a integridade desta barreira. Como visto anteriormente, num processo inflamatório, algumas substâncias, como histamina, serotonina (5HT), e bradicinina, liberadas podem alterar a permeabilidade vascular produzida por deslocação de proteínas. O efeito da bradicinina na barreira hematoencefálica é provavelmente indireto, embora um aumento na liberação de substância P (SP) e peptídeo-relacionado com gene da calcitonina (CGRP) de fibras sensoriais, prostaglandina (PG) e leucotrieno (LT) provavelmente também contribuem uma vez que seu precursor, ácido araquidônico, é formado em grande quantidade (Sercombe *et al.*, 2002).

A passagem de substâncias através da barreira hematoencefálica poderia ocorrer através de células endoteliais (a via transcelular) ou entre as células (a via paracelular). Em geral, a via transcelular permite entrada por difusão passiva, mas somente substâncias lipofílicas neutras com peso molecular de menos de 450 KDa. Há, entretanto, grupo de pequenas e grandes moléculas lipofílicas que podem penetrar o cérebro por transporte ativo transcelular. O transporte específico por proteínas transmembrana também existe para nutrientes essenciais tais como a glicose e certos aminoácidos. Outro sistema mediado por receptor é capaz de transportar macromoléculas tais como transferrina para o cérebro (Pardridge, 1997).

Íons e solutos se difundem entre células endoteliais adjacentes abaixo do gradiente de concentração. Entretanto, o espaço paracelular está quase completamente obstruído por junções íntimas (zona occludens), as quais são complexos juncionais célula-célula na região apical das membranas celulares. Estas junções previnem substâncias com pesos moleculares maior que 180 KDa da difusão paracelular, uma propriedade conhecida como função portão (Mitic e Anderson, 1998; Stevenson e Keon, 1998).

Componentes do sistema caliceína-cinina estão presentes no cérebro normal em baixas concentrações, a qual pode aumentar dramaticamente durante insultos cerebrais tais como isquemia/reperfusão (Wahl *et al.*, 1988). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a bradicinina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica para pequenas moléculas por ação no receptor B₂ (Unterberg *et al.*, 1984) e diminui a resistência elétrica do endotélio cerebral (Butt, 1995), sugerindo a abertura de junções íntimas. Labradimil, um agonista de receptor B₂,

tem sido usado para aumentar a distribuição de drogas no contexto de terapêutica do Sistema Nervoso Central (Emerich *et al.*, 2001). O processo celular no qual a bradicinina induz o aumento na permeabilidade de íons na barreira hematoencefálica inclui o aumento da concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ (Revest *et al.*, 1991), ativação da fosfolipase A_2 , liberação de ácido araquidônico e produção de radicais livres (Sarker e Fraser, 1994).

1.4. Bradicinina

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos com 9 – 11 aminoácidos incluindo bradicinina, calidina, T – cinina e seus metabólitos ativos, desArg⁹-Bradicinina (desArg⁹-BK) (Couture *et al.*, 2001).

A participação da bradicinina nos vários processos biológicos em diferentes espécies vem sendo investigada desde o trabalho pioneiro de Rocha e Silva, Beraldo e Rosenvfeld (1949). Neste trabalho, os autores demonstraram pela primeira vez a ação estimulante da bradicinina no íleo isolado de cobaia e o efeito hipotensor em cão.

Após a sua síntese por Boissonas *et al.* (1960), intensificaram-se os estudos com este peptídeo e vários efeitos farmacológicos foram encontrados. Entre eles, o efeito hipotensor em cão, coelho, gato e rato; o aumento da permeabilidade vascular em cobaia e rato; o efeito contrátil no intestino isolado de cobaia e rato e no útero e estômago de rato; e o efeito relaxante no duodeno de rato. Como alguns destes efeitos são sensíveis e específicos, eles têm sido usados como

bioensaios no estudo da bradicinina e cininas relatadas (Ferreira e Vane, 1967 Trautschold, 1970;).

A bradicinina, um nonapeptídeo, é um dos produtos mais importantes de uma série de processos patológicos que ocorrem seguido de uma lesão tecidual, como visto acima (Walker *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1996). Este poderoso peptídeo pró-inflamatório é liberado de seu precursor, o cininogênio de alto peso molecular, por clivagem proteolítica de proteases séricas específicas chamadas de calicreína como ilustrado pela figura 1 (Couture *et al.*, 2001). Como ilustrado na figura 2, um dos ativadores fisiológicos da pré-calicreína (que pode ser convertida em enzima ativa, a calicreína) é o fator de Hageman (fator XII da cascata de coagulação sangüínea), que se encontra na forma inativa no plasma, sendo ativado por contato com superfícies que têm uma carga negativa, como colágeno, membrana basal, lipopolissacarídeos bacterianos, cristais de ácido úrico e outros. Então o contato com superfícies negativamente carregadas promove a interação entre a pré-calicreína e o fator Hageman, levando a geração de cininas (Dale *et al.*, 1994).

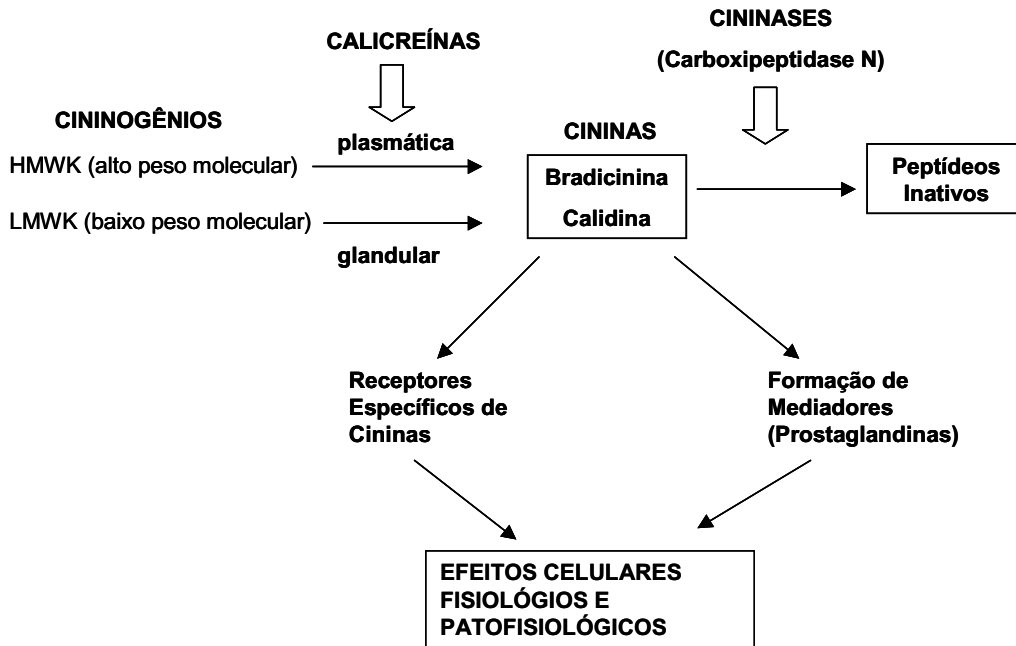


Figura 1: Esquema das vias de formação e de degradação das cininas.

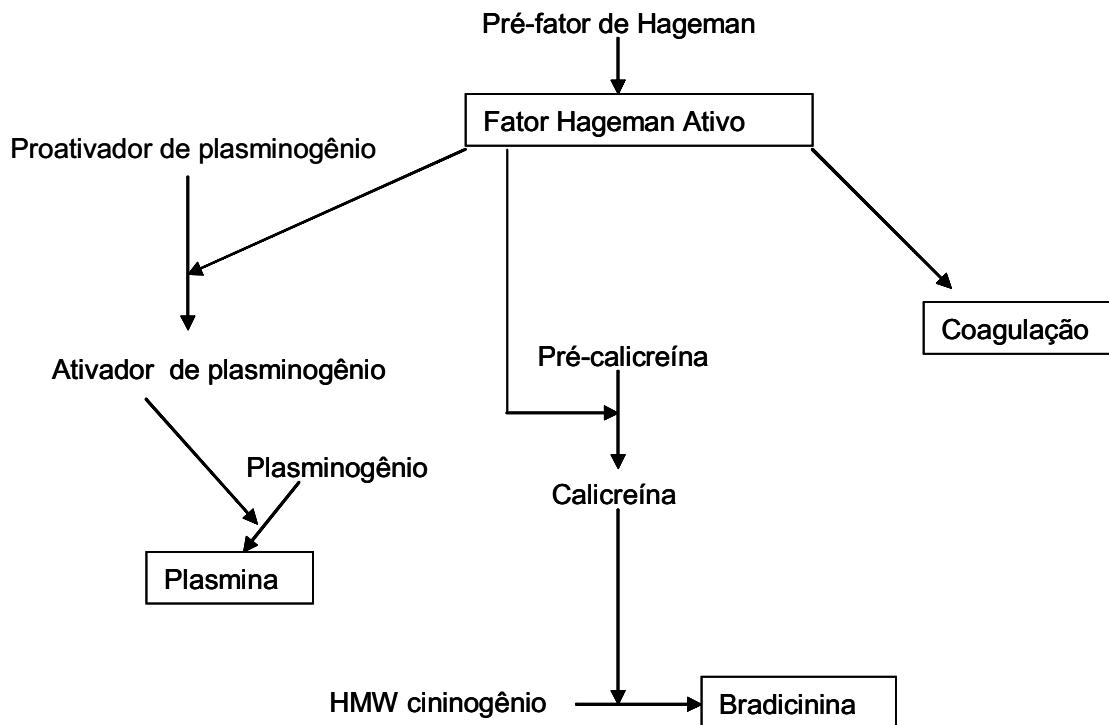


Figura 2: Diagrama ilustrando a inter-relação entre calicreína plasmática e sistema de coagulação (Adaptado de Katori et. al, 1975).

As cininas circulam em concentrações muito baixas no plasma e são degradadas em cerca de 15 segundos por um grupo de peptidases conhecidas como cininases. Em apenas uma passagem através do leito vascular pulmonar 80% a 90% das cininas podem ser destruídas. Cininases são encontradas no sangue, células endoteliais e outros tecidos. A cininase II é uma dipeptidil carboxipeptidase, também conhecida como Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), ou ainda E.C. 3.4.15.1, que remove o terminal C Phe-Arg da bradicinina e está localizada na face luminal da membrana de células endoteliais em grande quantidade, sendo a principal responsável pela hidrólise proteolítica local das cininas. Então a bradicinina, é convertida a bradicinina (1-7) e bradicinina (1-5), metabólitos inativos da bradicinina (Campbell *et al.*, 1995; Gainer *et al.*, 1998). Estudos imunohistoquímicos e biológicos demonstram a presença da ECA nos rins e na borda em escova da membrana das células do intestino delgado de mamíferos (Lembeck *et al.*, 1990), entretanto o principal local da ação desta enzima é o leito vascular do pulmão.

Inibidores da ECA podem exercer parte de seus efeitos farmacológicos via mecanismos autócrinos-parácrinos, incluindo não apenas o sistema renina-angiotensina, mas também o sistema calicreína-cinina. Estes inibidores atenuam a formação de Angiotensina II e levam cininas, como a bradicinina, a se acumularem por inibição de sua degradação. Então, eles previnem as ações sistêmicas e locais da Angiotensina II e potencializam os efeitos metabólicos e cardiovasculares da bradicinina (Campbell, 1995; Linz *et al.*, 1995). O captopril (D-3-mercaptopropanoil-L-prolina) é um inibidor enzimático seletivo da ECA (Marceau *et al.*, 1983). A terapia com inibidores da ECA, os antihipertensivos, está associada com

aumento da prevalência da tosse não produtiva e edema angioneurótico, podendo se classificar o captopril como tendo efeito pró-inflamatório (Emanueli *et al.*, 1998). Esses efeitos colaterais dos antihipertensivos são ocasionados por acúmulo de cininas e taquicinas, produzindo aumento do extravasamento plasmático no coração e liberação aumentada de muco nas vias aéreas.

Elliot *et al.*, 1960 mostraram que a bradicinina (BK) sintética injetada em tecidos normais causou vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e percepção da dor, sugerindo que este peptídeo mimetiza vários eventos inflamatórios distintos. E outros autores mostraram que a bradicinina está envolvida na formação de edema e vários outros aspectos que ativam a dor inflamatória, ativando e sensibilizando nociceptores (Steranka *et al.*, 1988; Dray e Perkins, 1993; Hall, 1997).

Foi observado ao nível do sistema nervoso, que a administração intracerebroventricular de bradicinina provoca alterações autonômicas (Ribeiro *et al.*, 1971; Correa e Graeff 1974, 1976; Correa *et al.*, 1979) e também de comportamento (Graeff e Arizawa, 1978). A descrição de um sistema neuronal com imunorreatividade semelhante à bradicinina no cérebro de rato tem sugerido um possível papel neurotransmissor para este peptídeo (Correa *et al.*, 1979).

Com respeito à localização e efeito das cininas, as ações destes peptídeos no sistema nervoso central (SNC), o qual contém todos os componentes do sistema calicreína-cinina, ainda torna-se muito controversa (Hall e Geppetti, 1995; Walker *et al.*, 1995; Raidoo e Bhoola, 1998; Couture e Lindsey, 2000). Uma alta densidade de sítios de ligação de cininas que está no SNC tem sido identificada certamente em vasos sanguíneos cerebrais. Porém, ambos receptores B₁ e B₂

têm sido identificados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e nas lâminas superficiais do corno dorsal, confinados com os terminais primários de fibras sensoriais da medula espinhal (Steranka *et al.*, 1988; Seabrook *et al.*, 1997; Couture e Lindsey, 2000; Wotherspoon and Winter, 2000).

Do ponto de vista clínico, também tem sido implicada a participação das cininas em algumas condições patológicas como na síndrome carcinóide e “dumping syndrome” pós-gastrectomia (Oates e Melmon, 1966; Roberts e Mashford, 1972; Colman *et al.*, 1976; Ishihara *et al.*, 2002; Taub *et al.*, 2003), no choque hemorrágico e endotóxico (Kellermeyer e Graham, 1968; Nies *et al.*, 1968), na pancreatite aguda (Roberts e Mashford, 1972), em doenças inflamatórias como na artrite reumática e outras formas de artrite (Melmon *et al.*, 1967; Eisen, 1970), em alterações vasculares da enxaqueca (Sicuteri, 1970), no infarto do miocárdio (Torstilla, 1978; Lagneux *et al.*, 2003), na broncoconstrição da asma (Collier *et al.*, 1960; Collier, 1963; Heitcsh, 2000) e no hiperbradicinismo (Streeten *et al.*, 1972). A importância do papel da BK nestas condições patológicas é ainda desconhecida, sendo também difícil à interpretação da sua participação em processos fisiológicos normais, como nos eventos celulares e vasculares que acompanham o processo inflamatório (Armstrong *et al.*, 1954; Lewis, 1970; Haberland e Rohen, 1973), como na hiperemia reativa em glândulas exócrinas (Hilton, 1970), como agente protetor contra a hipertensão (Mills, 1979) e na dor (Armstrong, 1970).

1.4.1 Receptores da Bradicinina

As cininas exercem seus efeitos farmacológicos através da ativação de seus receptores específicos. Em 1980, Regoli e Barabé subdividiram receptores de cininas em dois tipos diferentes: receptores B₁ e B₂. Os receptores B₁ pertencem à superfamília de receptores com sete domínios transmembrana (Figura 3), acoplados a proteína G. Sua ativação estimula a hidrólise de fosfoinositol e o aumento do [Ca⁺²]_i através da subunidade G α_q/11 e fosfolipase C (Austin *et al.*, 1997; Marceau *et al.*, 1998). Estes receptores estão localizados primariamente na musculatura lisa, e são induzidos *in vivo* e *in vitro* por endotoxinas bacterianas, citocinas, fatores de crescimento e durante lesão tecidual e inflamação.

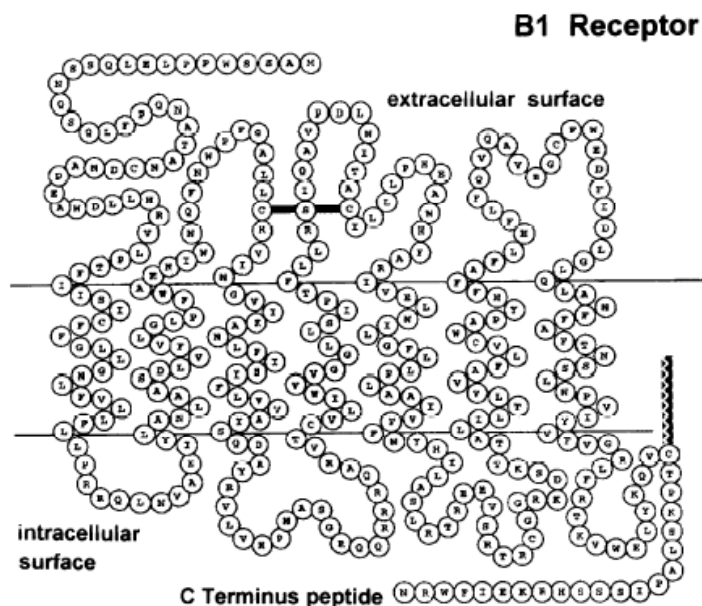


Figura 3: Esquema do receptor B₁. O N terminal extracelular, o C terminal intracelular e os 7 domínios transmembrana do receptor mostram grande homologia com o receptor B₂ (Fonte Raidoo e Bhoola, 1997).

Os receptores B₂ estão localizados em células endoteliais e na musculatura lisa, sendo expressos constitutivamente (Marceau, 1998). Assim como o receptor B₁, o receptor B₂ pertence à família de receptores com sete domínios transmembranares (Figura 4), ligados à proteína G (G α e G β), que quando ativada promove, via estimulação das fosfolipases A₂ e C, um aumento de [Ca²⁺]_i e a formação de prostaciclina I₂, óxido nítrico e fator de ativação plaquetária (Linz *et al.*, 1995) entre outros.

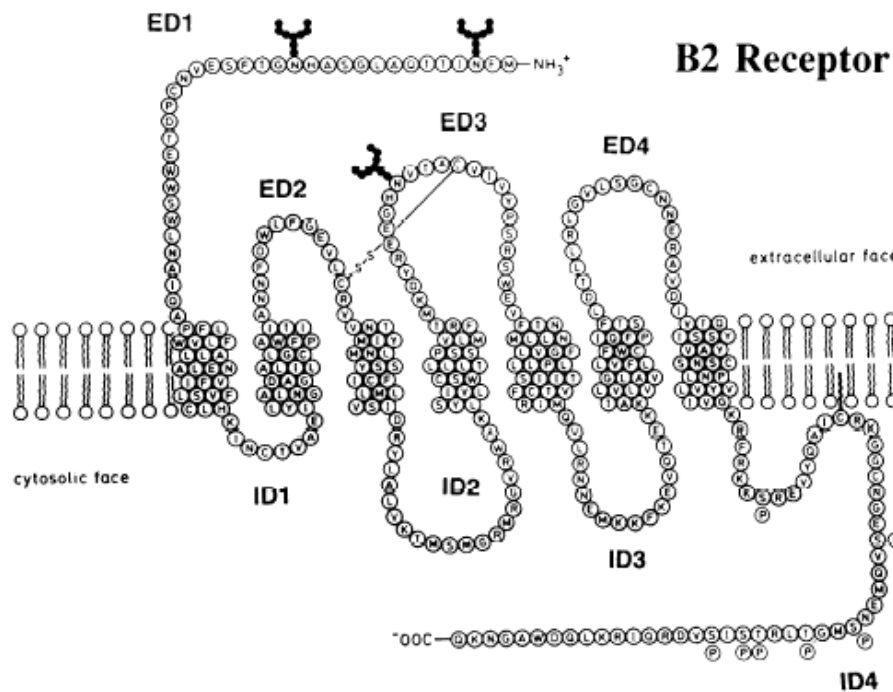


Figura 4: Esquema do receptor B₂ (Fonte Raidoo e Bhoola, 1997).

Os dois subtipos de receptores de cininas B₁ e B₂ medeiam atividades biológicas de cininas como a BK, calidina (lys-BK), desArg⁹-BK e desArg¹⁰-Calidina (desArg9-KD) (Hess *et al.*, 2002).

A diversidade entre receptores de cinina B₁ e B₂ de mamíferos resulta em perfis farmacológicos distintos. BK e lys-BK são os agonistas endógenos do receptor B₂, enquanto que desArg⁹-bradicinina e a desArg¹⁰-calidina são agonistas preferenciais do receptor B₁ (Couture *et al.*, 2001). Existem evidências sugerindo que a calicreína e algumas outras proteases ativam receptores B₂ diretamente, independente da liberação de bradicinina, sendo então proposto como um novo grupo de receptores ativados por proteases séricas (Hecquet *et al.*, 2000).

Uma vez formada na periferia, cininas ativam fibras A delta e C nos nervos sensoriais produzindo dor, hiperalgesia ou alodinia em humanos e animais experimentais. Ainda, podem ter efeitos indiretos mediados pela liberação de mediadores pro-inflamatórios e hiperalgésicos tais como neuropeptídeos, neurocininas e peptídeo-relacionado com gene da calcitonina (CGRP), óxido nítrico e metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, os quais também participam das propriedades pró-inflamatórias e nociceptivas (Dray e Perkins, 1997; Calixto *et al.*, 2000; Campos e Calixto, 2000; Calixto *et al.*, 2001;).

Segundo Siebeck *et al.*, (1998), enquanto que o receptor B₂ é constitutivo, o receptor B₁ é geralmente ausente no tecido normal e animais saudáveis, mas expressos em animais com infecção estabelecida. Foi mostrado, então, que o receptor B₁ é induzido e superexpresso durante a injúria tecidual, como por exemplo, seguido do tratamento com endotoxinas bacterianas e citocinas tais como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Marceau *et al.*, 1997; 1998).

Resultados obtidos com modelos animais sugerem que receptores B₂ estão envolvidos na fase aguda da resposta inflamatória e nociceptiva, enquanto que os

receptores B₁ participam da fase crônica da resposta (Dray e Perkins, 1993; Dray, 1997). Isto ocorre porque as funções do receptor B₂ são controladas por mecanismos de curta duração envolvendo rápida dissociação do ligante, dessensibilização do receptor e internalização com uma estimulação de longa duração, como a diminuição da expressão (downregulation) (Munoz e Leeb-Lundberg, 1992; Munoz *et al.*, 1993; Mathis *et al.*, 1996; Faussner *et al.*, 1999; Phagoo *et al.*, 1999; Marceau *et al.*, 2001). Ao contrário, os receptores B₁ elicitam respostas persistentes e sinalização que são subjetivas para uma dessensibilização limitada e internalização do receptor com uma dissociação muito lenta do ligante (Mathis *et al.*, 1996; Austin *et al.*, 1997; Faussner *et al.*, 1999).

1.4.1.1 O papel específico do receptor B₁ na inflamação

Os efeitos pró-inflamatórios dos receptores B₁ incluem promoção do tráfico de leucócitos, edema e dor (Couture *et al.*, 2001).

Num modelo animal mostrado por Perron *et al.* (1999), onde a inflamação foi induzida por injeção intravenosa de Sephadex, a ativação do receptor B₁ induziu infiltração leucocitária pulmonar, a qual foi bloqueada por um antagonista do receptor B₁.

Um receptor B₁ constitutivo foi encontrado mediando a resposta inflamatória induzida por injeção intrapleural de agonistas B₁ no modelo de pleurisia. Esta resposta inflamatória que incluiu permeabilidade vascular aumentada e influxo celular, certamente de neutrófilos e em menor extensão células mononucleares, foi mediada pela liberação de neuropeptídeos sensoriais primários, tais como a

substância P e peptídeo-relacionado com gene calcitonina (CGRP) e também por óxido nítrico (Vianna e Calixto, 1998). Substância P e CGRP induzem expressão rápida de moléculas de adesão celular (E-selectina, P-selectina e molécula de adesão intercelular 1), as quais têm um papel primário no desenvolvimento e adesão de neutrófilos circulantes (Matis *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 1995).

Os receptores B₁ podem ativar indiretamente fibras aferentes sensoriais C através da liberação de prostaglandinas (Dray e Perkins, 1993), mastócitos (McLean *et al.*, 2000) e citocinas, especialmente interleucina 1 (Perretti *et al.*, 1993; Ahluwalia e Perretti, 1994).

Foi mostrado também que porcos em condições inflamatórias pré-existentes, mostram uma resposta hipotensiva aumentada ao agonista B₁. Enquanto que animais sem sinais de infecção não respondem ou somente respondem a altas doses de agonista B₁. O que sugere que o receptor B₁ aumenta sua expressão (upregulation) e após a indução com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Siebeck *et al.*, 1998).

Em termos de eventos envolvidos na inflamação, foi mostrado que os receptores B₁ podem contribuir *in vivo* para o recrutamento de leucócitos, mas parece ser através de um mecanismo indireto (Ahluwalia e Perretti, 1996) e que um acúmulo de leucócitos é parcialmente prevenida pelo [Leu]⁸desArg⁹-BK (antagonista B₁), mas não por HOE 140 (antagonista B₂). Além disso, a desArg⁹-BK aumentou a migração de leucócitos sendo inibido por antagonistas de substância P e CGRP (Ahluwalia e Perretti, 1996), indicando que a estimulação dos aferentes sensoriais pela desArg⁹-BK provavelmente liberaram

neuropeptídeos localmente, que então, determinaram a resposta quimiotática (Marceau *et al.*, 1998).

A expressão do receptor B₁ foi mostrada em baixas concentrações na maioria dos tecidos em animais controle e induzida em tecidos inflamados, por exemplo, após o tratamento com LPS (Marceau *et al.*, 1997).

Dentre os eventos vasculares envolvidos na inflamação, Hayashi *et al.* (2002) mostraram que a expressão de RNAm do receptor B₁ induzido na pleura aumentou de 3 a 5 horas após a injeção de carragenina na cavidade pleural e que a injeção exógena de desArg⁹-BK na cavidade pleural provocou um aumento significativo no extravasamento plasmático. A administração de antagonistas do receptor B₁, ([Leu]⁸desArg⁹-BK ou desArg⁹-D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) significativamente reduziu a taxa de exsudação. Porém, em ratos deficientes de cininogênios, a administração intrapleural de desArg⁹-BK não resultou num aumento maior do extravasamento plasmático. Portanto, a desArg⁹-BK gerada endogenamente poderia contribuir para o extravasamento plasmático na pleurite induzida por carragenina, via mediação de um receptor B₁ induzível.

No sistema nervoso do rato, receptores B₁ funcionais foram encontrados na medula espinhal e sua ativação provavelmente facilita o reflexo nociceptivo, como mostrado nos camundongos “knock-out” de receptores B₁, que reduziram o reflexo nociceptivo (Pesquero *et al.*, 2000). Dray *et al.* (1997), mostraram que a ativação do receptor B₁ pode ter efeitos indiretos nos neurônios pela estimulação da liberação de outros mediadores neuroativos de células imunes.

Através de técnicas de imunomarcação, os receptores B₁ foram localizados nos neurônios humanos do tálamo, medula espinhal e hipotálamo (Raidoo e Bhoola, 1997).

Foi mostrado que antagonistas de receptores B₁ tornam-se mais progressivamente efetivos em reduzir o extravasamento plasmático inflamatório basal usando o modelo de artrite crônica induzida por antígeno (Cryws *et al.*, 1994).

Um estudo, realizado com coelhos tratados com lipopolissacarídeo (LPS), uma resposta hipotensiva foi observada com um agonista desArg⁹-BK seletivo para receptor B₁, não sendo observada em animais controles (Regoli *et al.*, 1981; Marceau *et al.*, 1983). Este efeito foi bloqueado por um antagonista competitivo de receptor B₁, desArg¹⁰-[Leu]⁹calidina (Nwator e Whalley, 1989). Um estudo recente demonstrou que endotoxinas aumenta a formação de edema mediado por receptor B₁ em modelos de primatas não-humanos (DeBlois e Horlick, 2001).

1.4.1.2 O papel específico de receptor B₂ na inflamação

Os receptores B₂, considerados receptores clássicos das cininas, medeiam a maioria das respostas biológicas induzidas pela bradicinina incluindo broncoconstricção, hipotensão, resposta inflamatória aguda, dor e hiperalgesia e estão presentes em vários tecidos (Steranka e Burch, 1991; Hall, 1997; Dray e Perkins, 1993). Estes receptores têm sido descritos em numerosas preparações *in vitro*, incluindo preparações intestinais, cardiovasculares, genito-urinária e trato respiratório e também em tecidos oculares e neuronais (Hall, 1997).

Alguns autores mostraram que a produção de edema e permeabilidade vascular aumentada são certamente mediados pelo receptor B₂ constitutivo em vários modelos de inflamação visceral aguda e cutânea tais como pancreatite e cistite ou ocorre em resposta ao tratamento com carragenina ou colagenase (Burch e DeHass, 1990; Wirth *et al.*, 1991; Décarie *et al.*, 1996; Griesbacher e Legat, 1997; 2000).

Whalley *et al.* (1984) mostraram que a medida do edema agudo produzido por injeção de cinina na pata do rato, baseado no uso de peptídeos agonistas e antagonistas, se deve ao envolvimento do receptor B₂, sem o significativo envolvimento de B₁. Então, um antagonista específico de B₂, como o FR 167344, exerce algumas atividades antiinflamatórias em modelos animais agudos associados com ativação do sistema calicreína-cinina (Asano *et al.*, 1997).

Em um modelo de infecção crônica com injeção de micobactéria BCG na pata do rato determinou um estado persistente de 10 semanas na sensibilidade ao desArg⁹-BK, medida através da formação de edema da pata após a injeção local (Campos *et al.*, 1997). A administração repetida de um agonista B₂, [Tyr⁸]-BK, na pata do rato sensibilizou o animal ao desArg⁹-BK, enquanto que o edema causado pelo [Tyr⁸]-BK exibiu taquifilaxia, sugerindo que a estimulação intensa de B₂ pode disparar diretamente ou indiretamente o aumento na expressão de receptores B₁ para amplificar a resposta tecidual as cininas durante a reação inflamatória (Campos *et al.*, 1997). No sistema nervoso sensorial do rato, receptores B₂ têm sido localizados nos gânglios da raiz dorsal e corno dorsal (Winter, 2000). Através de técnicas de imunomarcção, os receptores B₂ foram encontrados em neurônios no encéfalo de humanos, no tronco cerebral, núcleo basal, córtex cerebral, tálamo

e hipotálamo e também no seio dural sagital superior e epêndima do terceiro ventrículo e ventrículo lateral (Raidoo e Bhoola, 1997).

Trabalhos indicaram que o HOE 140 (D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) é um, antagonista específico e seletivo dos receptores B₂ *in vivo* e *in vitro* (Wirth *et al.*, 1991; Rhaleb *et al.*, 1992). Este antagonista mostrou a capacidade de bloquear o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina na traquéia de cobaias (Watanabe *et al.*, 1999) e na pata de ratos (Legat *et al.*, 1994). A ausência de efeito do HOE 140 na resposta a PGE₂, dopamina, TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 confirma a especificidade do HOE 140 relatada em outros sistemas e fornecem evidências de que os receptores B₂ não estão envolvidos na mediação de respostas a esses outros algésicos (Ferreira *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1995). Desta forma o desenvolvimento de antagonistas efetivos e metabolicamente resistentes dos receptores B₂ poderia contribuir para o tratamento dos sintomas de doenças como a artrite reumatóide e a gota, e talvez até modificar o curso das doenças, já que todos os constituintes do sistema calicreína-cinina foram identificados no fluido sinovial de pacientes com artrite de várias etiologias e outras doenças relacionadas (Blais *et al.*, 1997).

Quadro 1 - Principais características dos receptores das cininas

	Receptores B₂	Receptores B₁
Agonistas naturais	BK e calidina	DesArg ⁹ -BK e desArg ¹⁰ -KD
Principais agonistas seletivos	HOE 140, NPC 17731, WIN 64338, FR 177344, NPC 18884 e <i>bradyzide</i>	[Leu] ⁸ desArg ⁹ -BK, [Leu] ⁹ desArg ¹⁰ -KD, deaArg ¹⁰ -HOE 140, B 9858, R 715
Padrão de expressão	Constitutivos, sendo induzíveis na musculatura lisa das artérias, células sinoviais e pulmões humanos	São induzidos após traumas ou em processos inflamatórios. Expressos constitutivamente em alguns tecidos
Vias de transdução de sinal	Vias dependentes da PKC e do aumento transitório nas concentrações de Ca ⁺⁺	Vias dependentes da PKC e de um aumento sustentado nas concentrações de Ca ⁺⁺
Vias alternativas de sinalização	Sua estimulação pode ativar: MAPK, TK, PI3K	Sua expressão pode ser regulada pela ativação da MAPK, PKC e TK
Interação com outros sistemas envolvidos na inflamação	Estimulação da PLA ₂ , COX-1/2 e NOS, e indução de algumas citocinas (IL-1β, IL-6 e IL-8)	Sua expressão ocorre freqüentemente em paralelo a de outros componentes do processo inflamatório, como: COX-2 e NOS _i
Dissociação do agonista	Rápida	Lenta
Dessensibilização	Facilmente dessensibilizado	Normalmente resistem a dessensibilização, exceto quando expressos artificialmente
Envolvimento em respostas infamatórias e dolorosas	Associado a fase aguda da dor e da inflamação	Envolvida no estágio crônico da inflamação e da resposta dolorosa
Potencial terapêutico	Questionável, sua estimulação está freqüentemente relacionada a processos fisiológicos	Alta, é possível que antagonistas não-peptídicos seletivos para receptores B ₁ tenham utilidade no tratamento de doenças inflamatórias crônicas

Adaptado de Campos, (2001). NOS, óxido nítrico sintase; COX, ciclooxigenase; PKC, proteína quinase; TK, tirosina-quinase; MAPK, MAP-quinase; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase.

Apesar de terem sido realizados outros estudos em nosso laboratório, que utilizaram mediadores inflamatórios para verificar o extravasamento plasmático no sistema nervoso central, um ponto interessante a ser investigado é se a desArg⁹-BK e a bradicinina, agonistas dos receptores B₁ e B₂ das cininas, respectivamente, que como vistos anteriormente também participam ativamente do processo inflamatório, poderiam influenciar de alguma forma o extravasamento plasmático induzido na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Neste trabalho foi avaliada a participação dos receptores B₁ e B₂ das cininas mediando o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina e pela desArg⁹-BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos;
- Avaliar o efeito de antagonistas de receptores B₁ e B₂ sobre o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina e desArg⁹-BK;
- Verificar o efeito de doses sub-letais de LPS isoladamente no extravasamento plasmático e um possível envolvimento dos receptores B₁ e B₂;
- Analisar o envolvimento de receptores NK₁, da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da NO sintase no extravasamento plasmático induzido pela BK através do uso de antagonistas de receptor NK₁, inibidores da ECA e também através da inibição da enzima NO sintase, na ação das cininas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os experimentos seguiram os regulamentos oficiais de cuidado e tratamento com os animais (CEUA - protocolo 185), que foram mantidos em gaiolas de 6 elementos cada, com água e ração sólida peletizada, ambos *ad libitum*. A sala de manutenção tinha temperatura ambiente climatizada e mantida entre 22° e 24° C em ciclo de claro e escuro de 12 horas (luz das 7 às 19 horas). As administrações das substâncias foram realizadas via veia peniana dorsal, utilizando para tanto, agulhas 13 x 4,5 mm. Na maioria dos grupos experimentais utilizamos aproximadamente 10 animais.

3.2. Estudo do extravasamento plasmático

3.2.1. Azul de Evans como marcador

O corante azul de Evans foi usado como marcador para a quantificação do extravasamento plasmático, pois quando injetado intravenosamente, este se liga a uma proteína plasmática, a albumina, e assim permanece dentro do sistema vascular. Somente irá ocorrer extravasamento plasmático deste corante fluindo para os tecidos, na presença de mediadores químicos que promovam a formação

de poros ao longo do endotélio das vênulas pós-capilares. O extravasamento plasmático foi avaliado pela medida do conteúdo de azul de Evans nos tecidos selecionados.

3.2.2. Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso através da via intraperitoneal. As veias jugulares foram dissecadas através de incisão na região cervical anterior e isoladas com fio de algodão para posterior secção e perfusão. Após anestesia e dissecação das veias, os animais foram submetidos a diversos tratamentos conforme protocolo experimental adiante. Subseqüentemente o extravasamento plasmático dos órgãos em estudo foi avaliado, como descrito a seguir.

Foi administrado intravenosamente, na dose de 20 mg/Kg, uma solução do corante azul de Evans na concentração de 25 mg/ml em salina 0,9%. Depois de 10 minutos o tórax foi aberto e uma cânula foi colocada no interior da aorta através do ventrículo esquerdo para perfusão com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) para a circulação cerebral sendo as veias jugulares cortadas (Mossauoui *et al.*, 1993). Os animais foram perfundidos com 60 ml dessa solução por 3 minutos para a remoção do corante da circulação cerebral. Subseqüentemente ocorreu a decapitação dos animais com posterior incisão no couro cabeludo e calota craniana na altura da sutura sagital, desde o focinho até a base do crânio. Após craniotomia na sutura sagital com posterior afastamento das porções cranianas, o

encéfalo foi retirado. Cuidadosamente fez-se o descolamento da dura-máter da estrutura óssea craniana e em seguida foram separados dois fragmentos de tamanhos e pesos semelhantes. Também foram removidos e separados dois fragmentos do cerebelo e do córtex. Os tecidos foram lavados em salina e em seguida rapidamente colocados em papel filtro e imediatamente pesados. Um fragmento de cada tecido foi seco em estufa a 50° C por 24 horas e repesados. O azul de Evans foi extraído dos tecidos remanescentes por incubação em formamida na concentração de 4 ml/mg de tecido na temperatura ambiente por 24 horas. Para a medida de densidade óptica da solução de azul de Evans foram retiradas alíquotas de 75µl de cada tecido incubado em formamida e colocadas em placas de 96 poços apropriadas para leitura em um leitor de Elisa (Titertek Multiskan). Um filtro que permitia a leitura de comprimento de onda de 620 nm foi utilizado. O conteúdo do azul de Evans de cada tecido foi expresso em microgramas de azul de Evans por grama de tecido seco prevenindo desta forma erros decorrentes da possível formação de edema (Nicolau *et al.*, 1993). O azul de Evans extravasado foi quantificado pela interpolação em uma curva padrão de diluição do corante em uma concentração de 0,5-25 µg/ml de azul de Evans em formamida e expresso como µg de corante/g de tecido seco (Warwick *et al.*, 1995).

Assim, os resultados foram expressos em µg de azul de Evans/g de tecido seco, onde o produto de Abs x K é dividido pela relação do peso seco/peso úmido.

Abs = leitura espectrométrica da absorbância em 620 nm.

K = constante calculada a partir da curva padrão de azul de Evans.

3.3. Grupos experimentais

3.3.1. Efeito da bradicinina (BK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos e da administração de antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ sobre este extravasamento plasmático.

Para verificar o efeito da BK no extravasamento plasmático, foi utilizada a dose que provocou queda na pressão arterial de ratos anestesiados (Nicolau *et al.*, 1996) e a que induziu o aumento do extravasamento plasmático em diversos tecidos de ratos (Wille *et al.*, 2001; Nicolau *et al.*, 2003). Posteriormente a dose de BK foi reduzida para que o extravasamento plasmático na dura-máter pudesse ser observado.

Em uma série de experimentos, os ratos receberam BK, um agonista de receptores B₂, isoladamente ou associada ao pré-tratamento com antagonistas seletivos de receptores: B₁ ([Leu]⁸desArg⁹-BK) e B₂ (HOE-140) das cininas. Primeiramente no grupo controle, foi administrado azul de Evans em solução salina a 0,9%. O extravasamento plasmático foi induzido pela BK nas concentrações (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 nmol/Kg, i.v.), associado com azul de Evans.

Nos animais tratados com antagonistas, estes foram administrados dez minutos antes da injeção intravenosa de BK, num grupo o HOE-140 (10 nmol/Kg, i.v.) e em outro grupo o [Leu]⁸desArg⁹-BK (1 nmol/Kg, i.v.).

3.3.2. Efeito da desArg⁹-BK (DABK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos e da administração de antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ sobre este extravasamento plasmático.

Em outra série de experimentos, os ratos receberam DABK, um agonista de receptores B₁, isoladamente ou associada ao pré-tratamento com antagonistas seletivos de receptores: B₁ ([Leu]⁸desArg⁹-BK) e B₂ (HOE-140) das cininas. O extravasamento plasmático foi induzido pela DABK nas concentrações (0,03; 0,1; 0,3; 1 e 3 nmol/Kg, i.v.), associado com azul de Evans.

Nos animais tratados com antagonistas, estes foram administrados dez minutos antes da injeção intravenosa de DABK, num grupo o [Leu]⁸desArg⁹-BK (1 nmol/Kg, i.v.) e em outro grupo o HOE-140 (10 nmol/Kg, i.v.).

3.3.3. Efeito da administração do antagonista de receptores NK₁ sobre o extravasamento plasmático induzido pela bradicinina na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

Num grupo de animais um antagonista de receptor NK₁, o RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.), foi injetado 10 minutos antes da administração de BK (0,3 nmol/Kg, i.v.).

3.3.4. Efeito da administração de um inibidor de NO sintase sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK e no extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

O inibidor da NO sintase, N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 10 nmol/Kg, i.v.), em um grupo de animais o L-NAME foi injetado 10 minutos antes da administração de BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), e em outro grupo o pré-tratamento com L-NAME foi administrado 10 minutos antes da injeção de DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.).

3.3.5. Efeito do captopril (CAP) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

O CAP (10 nmol/Kg, i.v.), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), em um grupo experimental foi administrado isoladamente. Em outro grupo, o CAP (10 nmol/Kg, i.v.) foi injetado 10 minutos antes da administração da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.). E um terceiro grupo de animais foi pré-tratado (10 minutos) com HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), depois de 10 minutos foi injetado o CAP (10 nmol/Kg, i.v.) e após 10 minutos foi administrada a BK (0,3 nmol/Kg, i.v.).

3.3.6. Efeito do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

Em um grupo de animais o LPS (100 µg/Kg, i.v.), foi injetado isoladamente 24 horas antes da injeção do corante azul de Evans. Em outro grupo, os animais foram pré-tratados (24 horas) com LPS, e então administrado o DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.). Outros dois grupos de animais foram também pré-tratados (24 horas) com LPS, em um deles foi administrado [Leu]⁸desArg⁹-BK (1 nmol/Kg, i.v.) 10 minutos antes da injeção de DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.). E no outro grupo foi administrado o HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da injeção de DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.).

3.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (± EPM) e os dados avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls, para múltiplas comparações.

Como nível de significância, foi adotado um valor de $p < 0,05$. A análise foi realizada, através de um programa estatístico (Statistica versão 5.0 – Statsoft Inc.).

3.5. Drogas

Corante azul de Evans, DABK, BK, [Leu]⁸desArg⁹-BK, HOE-140, LPS, captopril e L-NAME foram obtidos do laboratório Sigma Chemicals Co (St Louis, USA); RP 67580 foi gentilmente doado pelo Dr. Regoli (University of Sherbrooke, Quebec, Canadá). A formamida foi obtida do laboratório Merck e o pentobarbital sódico (Hypnol®) do laboratório Cristália, Brasil.

3.6. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: 1- Leitor de Elisa Titertek Multiskan (Flow Laboratories, McLean, Va.) equipado com filtro de leitura em 620 nm de comprimento de onda para 96 poços. 2- Bomba Dosadora Peristáltica Milan modelo 202. 3- Balança de precisão (0-0,1 mg) marca Sartorius.

4. Resultados

4.1. Efeito da bradicinina (BK) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

A administração intravenosa de BK (0,03 nmol/Kg, i.v.) não induziu alteração significativa em nenhum dos seguintes tecidos: dura-máter, cerebelo e córtex. A BK na dose de 0,1 nmol/Kg, i.v., induziu um aumento significativo de 39% no extravasamento do corante azul de Evans na dura-máter comparado ao grupo controle. O extravasamento do corante no cerebelo e no córtex não foi afetado. Doses de bradicinina 0,3; 1 e 3 nmol/Kg, i.v., induziram um aumento dose-dependente e significativo do extravasamento do corante azul de Evans na dura-máter de 73%, 56% e 65%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Uma dose maior de BK (10 nmol/Kg, i.v.) aumentou em apenas 31% na dura-máter, não significativa em relação ao grupo controle. Nos demais tecidos, córtex e cerebelo, as doses testadas não alteraram significativamente o extravasamento plasmático (Fig. 5, Tab. I).

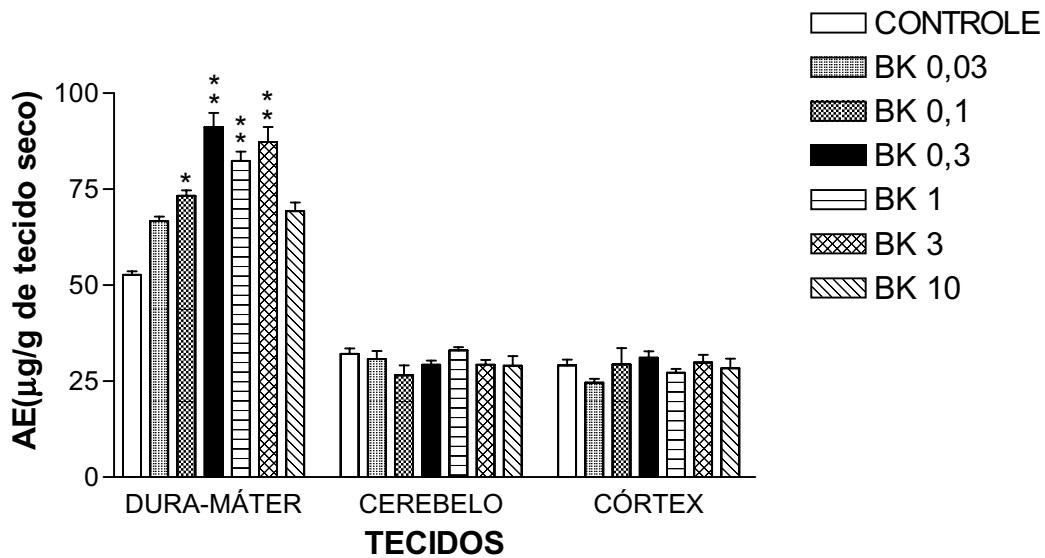


FIGURA 5 - Efeito da BK (0,03 a 10 nmol/Kg, i.v.) no extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. A concentração de azul de Evans de cada tecido foi usada como índice quantitativo do extravasamento plasmático. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.
 * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam as diferenças significativas do efeito da BK em relação ao grupo controle.

TABELA I – Efeito do extravasamento plasmático induzido pela BK (0,03 a 10 nmol/Kg i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

BK (nmol/Kg)	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
0,03	66,7 ± 1,2 (n=6)	30,8 ± 2,1 (n=6)	24,6 ± 1 (n=6)
0,1	73,3 ± 1,4 (n=5) *	26,5 ± 2,6 (n=6)	29,4 ± 4,2 (n=6)
0,3	91,2 ± 3,7 (n=12) **	29,3 ± 1,1 (n=20)	31,1 ± 1,7 (n=18)
1	82,4 ± 2,4 (n=19) **	33 ± 0,9 (n=23)	27,2 ± 1 (n=31)
3	87,3 ± 3,9 (n=17) **	29,3 ± 1,2 (n=25)	29,9 ± 2 (n=17)
10	69,3 ± 2,2 (n=11)	29 ± 2,5 (n=09)	28,4 ± 2,5 (n=09)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração de BK. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

* p<0,05 e ** p<0,01 indicam as diferenças estatisticamente significantes do efeito das doses de BK em relação ao grupo controle.

4.1.1. Efeito de antagonistas e receptores B₁ e B₂ sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK

O pré-tratamento com o antagonista de receptores B₂, HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da administração da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), reduziu significativamente em 51,2%, o extravasamento plasmático na dura-máter, comparado ao efeito da BK administrada isoladamente (Fig. 6, Tab. II). A administração de HOE 140 isoladamente não modificou o extravasamento plasmático nos tecidos analisados (resultados não mostrados).

A administração isolada do antagonista de receptores B₁, [Leu]⁸des Arg⁹-BK (LDABK, 1 nmol/Kg, i.v.), não modificou o extravasamento plasmático nos tecidos analisados (Fig. 7, Tab. II). O pré-tratamento com este antagonista, 10 minutos antes da administração da BK (1 nmol/Kg, i.v.), não reduziu o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter (Fig. 7, Tab. II).

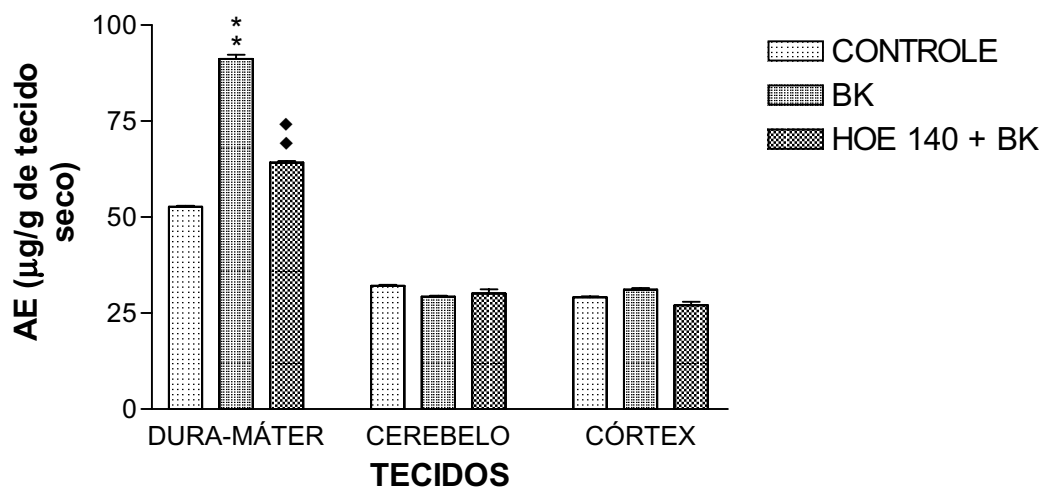


FIGURA 6 - Efeito da administração do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da BK em relação ao grupo controle.

◆◆ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do antagonista B_2 , (HOE 140), associado a dose de BK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela BK.

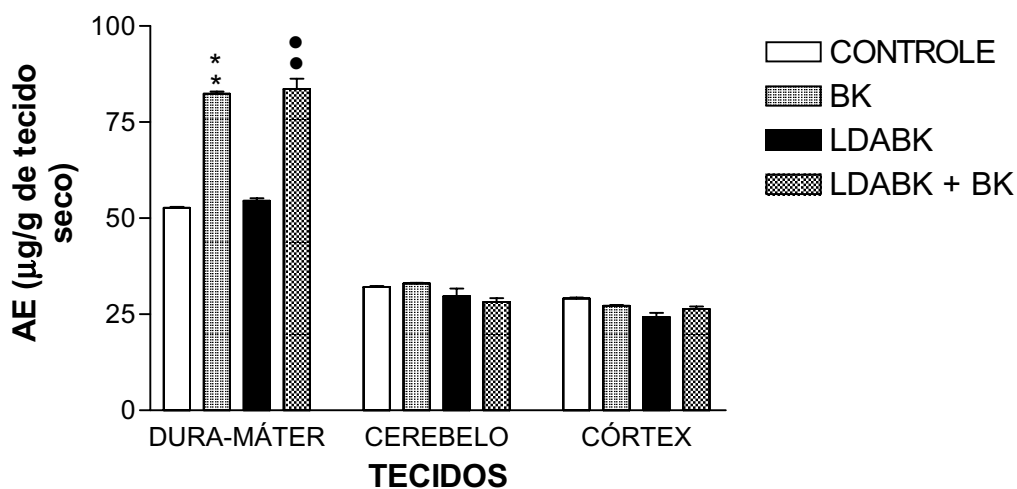


FIGURA 7 - Efeito da administração do [Leu]⁸desArg⁹-BK (LDABK, 1 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (1nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da BK em relação ao grupo controle.

●● p<0,01 indica a diferença estatisticamente significativa do efeito do antagonista B₁, (LDABK), + BK comparado com o grupo controle.

TABELA II – Efeito da administração do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) e da administração do [Leu]⁸desArg⁹-BK (LDABK, 1 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (1 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
BK 0,3	91,2 ± 3,7 (n=12) **	29,3 ± 1,1 (n=20)	31,1 ± 1,7 (n=18)
HOE 140 + BK 0,3	64,2 ± 1,2 (n=09) ♦♦	30,1 ± 3,1 (n=8)	27 ± 2,8 (n=8)
BK 1	82,4 ± 2,4 (n=19) **	33 ± 0,9 (n=23)	27,2 ± 1 (n=31)
LDABK 1	54,5 ± 1,9 (n=7)	29,7 ± 4,9 (n=6)	24,3 ± 2,4 (n=5)
LDABK 1 + BK 1	83,6 ± 7,2 (n=7) ●●	28,2 ± 2,8 (n=8)	26,4 ± 1,8 (n=8)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração de BK (0,3 nmol/Kg i.v.) isoladamente ou em presença de HOE 140, e da BK (1 nmol/Kg i.v.) isoladamente ou em presença de LDABK . Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

** p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da BK (0,3 e 1 nmol) em relação ao grupo controle.

♦♦ p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do HOE 140, associado à dose de BK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela BK.

●● p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do LDABK, associado à dose de BK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela BK.

4.2. Efeito da desArg⁹-BK (DABK) no extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

A administração intravenosa de DABK (0,03 nmol/Kg, i.v.), não alterou o extravasamento plasmático do corante azul de Evans na dura-máter, cerebelo e córtex de rato. Já a elevação na dose deste agonista B₁ para 0,1 nmol/Kg, i.v. induziu um aumento significativo de 39% no extravasamento plasmático de azul de Evans na dura-máter em relação ao grupo controle. Sem alterar o extravasamento do corante nos outros tecidos estudados (cerebelo e córtex). O aumento da dose de DABK para 0,3 e 1 nmol/Kg, i.v., aumentou de forma dose-dependente o extravasamento plasmático na dura-máter de forma significativa em 68% e 63%, respectivamente, em relação ao controle, mas sem qualquer tipo de modificação nos demais tecidos. A maior dose de DABK (3 nmol/Kg, i.v.), não alterou de forma significativa o extravasamento plasmático nos tecidos analisados (dura-máter, cerebelo e córtex) (Fig. 8, Tab. III).

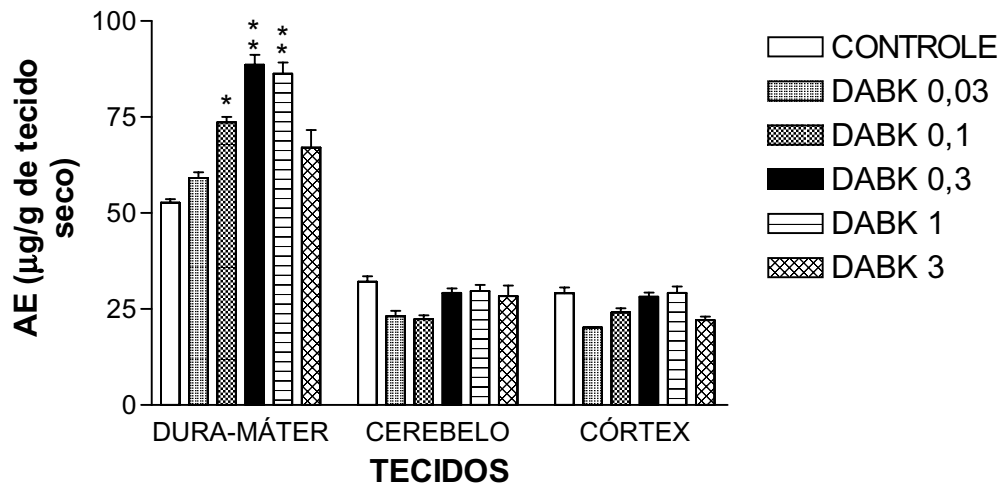


FIGURA 8 - Efeito da DABK (0,03 a 3 nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. A concentração de azul de Evans de cada tecido foi usado como um índice quantitativo do extravasamento plasmático. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.
 * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam as diferenças significativas do efeito das doses de DABK em relação ao grupo controle.

TABELA III – Efeito da DABK (0,03 a 3 nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

DABK (nmol/Kg)	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
0,03	59,1 ± 1,5 (n=6)	23,1 ± 1,4 (n=6)	20,2 ± 0,6 (n=6)
0,1	73,6 ± 1,4 (n=5) *	22,4 ± 1 (n=5)	24,1 ± 1,1 (n=5)
0,3	88,6 ± 2,6 (n=20) **	29,2 ± 1,2 (n=26)	28,2 ± 1,1 (n=24)
1	86,3 ± 2,9 (n=9)**	29,7 ± 1,6 (n=13)	29,2 ± 1,7 (n=14)
3	67 ± 4,6 (n=6)	28,4 ± 2,7 (n=7)	22,1 ± 0,9 (n=5)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração de DABK. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

* p<0,05 e ** p<0,01 indicam as diferenças significativas do efeito das doses de DABK em relação ao grupo controle.

4.2.1. Efeito de antagonistas B₁ e B₂ sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK

O pré-tratamento dos animais com o [Leu]⁸des Arg⁹-BK (LDABK, 1 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da administração da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.), reduziu significativamente em 57% o extravasamento plasmático na dura-máter, comparado ao efeito isolado da DABK. Não foi observada alteração no extravasamento plasmático no cerebelo e no córtex (Fig. 9, Tab. IV).

Contudo, a administração do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.), não reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pelo agonista B₁ na dura-máter (Fig. 10, Tab. IV).

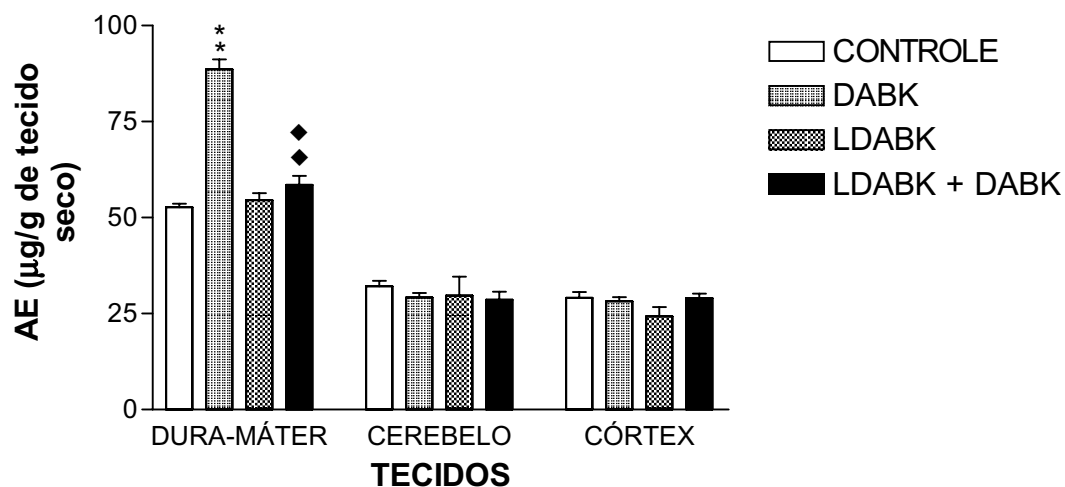


FIGURA 9 - Efeito da administração do LDABK (1 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da DABK em relação ao grupo controle.

◆◆ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do antagonista LDABK, + DABK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela DABK.

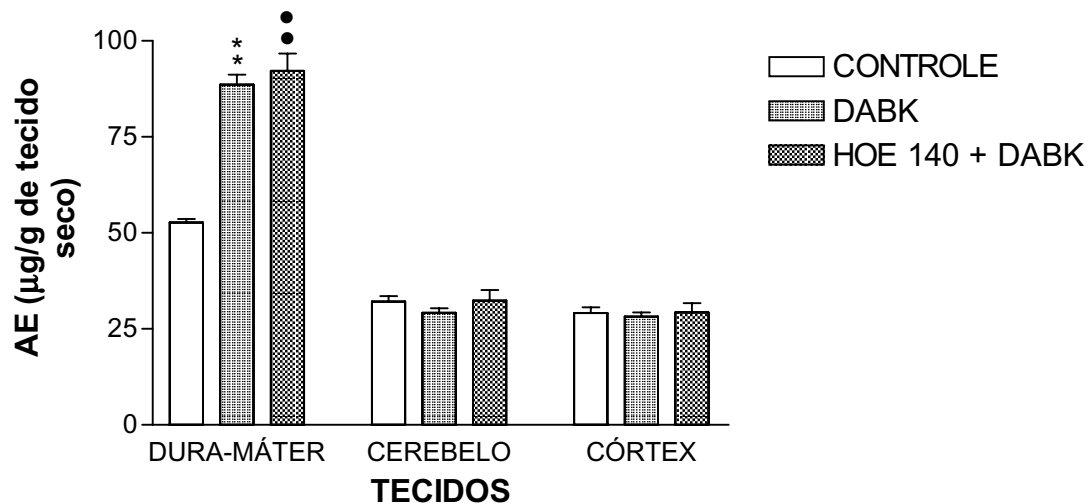


FIGURA 10 - Efeito da administração do HOE 140 (10 nmol/Kg i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do extravasamento plasmático induzido pela DABK em relação ao grupo controle.

●● $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do extravasamento plasmático induzido pelo antagonista HOE 140 , + DABK comparado com o grupo controle.

TABELA IV – Efeito do pré-tratamento com LDABK (1 nmol/Kg i.v.) e do HOE 140 (10 nmol/Kg i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
DABK	88,6 ± 2,6 (n=20) **	29,2 ± 1,2 (n=26)	28,2 ± 1,1 (n=24)
LDABK	54,5 ± 1,9 (n=7)	29,7 ± 4,9 (n=6)	24,3 ± 2,4 (n=5)
LDABK + DABK	58,5 ± 2,4 (n=15) ♦♦	28,6 ± 2,1 (n=10)	29 ± 1,2 (n=16)
HOE 140 + DABK	92,2 ± 4,5 (n=11) ●●	32,4 ± 2,7 (n=11)	29,3 ± 2,4 (n=8)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração de DABK isoladamente ou em presença de LDABK ou de HOE 140. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-keuls para múltiplas comparações.

** p<0,01 indicam as diferenças estatisticamente significantes do efeito da dose de DABK (0,3 nmol) em relação ao grupo controle.

♦♦ p<0,01 indica a diferença estatisticamente significativa do efeito do LDABK, associado à dose de DABK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela DABK.

●● p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do HOE 140, associado à dose de DABK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pela DABK.

4.2.2. Efeito do LPS sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

A administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 100 µg/Kg, i.v.), 24 horas antes da injeção do corante azul de Evans, induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático em 71% na dura-máter, em relação ao controle. O LPS não provocou alterações significativas no cerebelo e no córtex (Fig. 11, Tab. V). O pré-tratamento dos animais com LPS (100 µg/Kg, i.v.), 24 horas antes, aumentou o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter de forma não significativa, comparado ao grupo tratado com desArg⁹-BK. Este tratamento não afetou o extravasamento nos outros tecidos analisados (Fig. 11, Tab. V).

A injeção de [Leu]⁸des Arg⁹-BK (LDABK, 1 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da injeção da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.), num grupo de animais pré-tratados 24 horas antes com LPS, foi observado a redução significativa no extravasamento plasmático na dura-máter em 52,8%. O extravasamento plasmático nos demais tecidos estudados não foi alterado (Fig. 12, Tab. V).

Em outro grupo de animais pré-tratados 24 horas antes com LPS, a administração do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.) 10 minutos antes da injeção da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.), não alterou o extravasamento plasmático, comparado ao grupo tratado com desArg⁹-BK, de forma significativa na dura-máter, cerebelo e no córtex, respectivamente (Fig. 13, Tab. V).

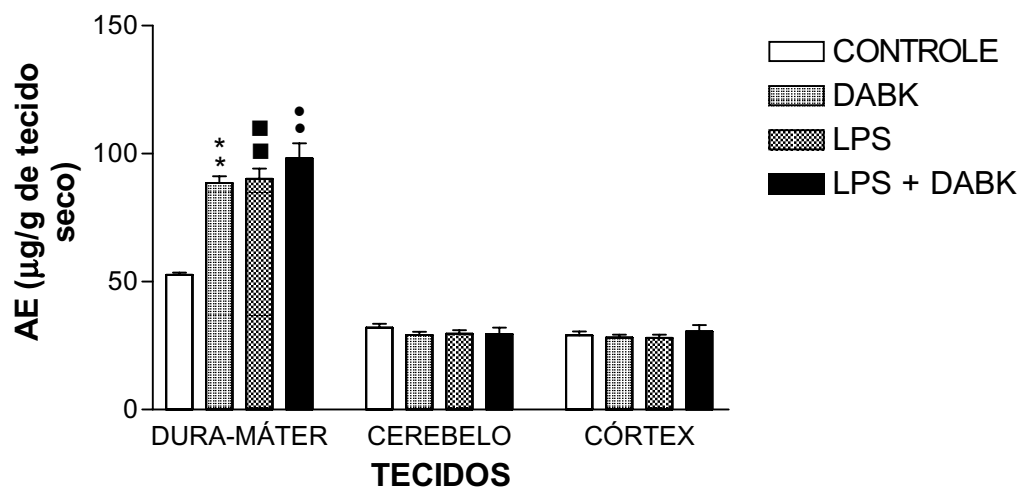


FIGURA 11 - Efeito do pré-tratamento com LPS (100 µg/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da DABK em relação ao grupo controle.

■ p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do LPS em relação ao grupo controle.

●● P<0,01 indica a diferença significativa do efeito da associação entre o LPS e DABK em relação ao grupo controle

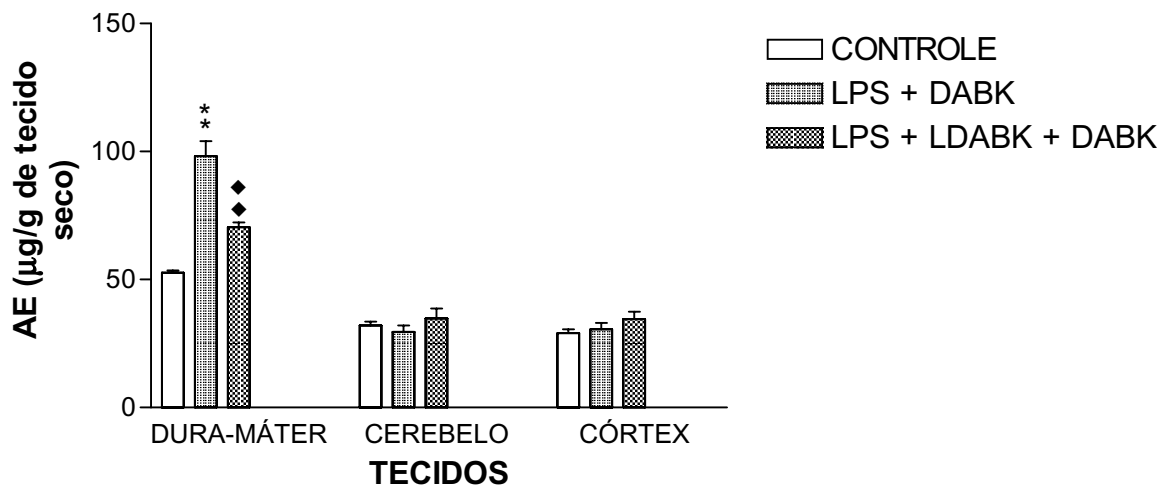


FIGURA 12 - Efeito do pré-tratamento de LPS (100 ml/Kg, i.v.) com DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) isoladamente ou em presença de LDABK (1nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito das doses de LPS e DABK em relação ao grupo controle.

◆◆ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do antagonista LDABK, sobre a associação entre o LPS+DABK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pelo LPS+DABK.

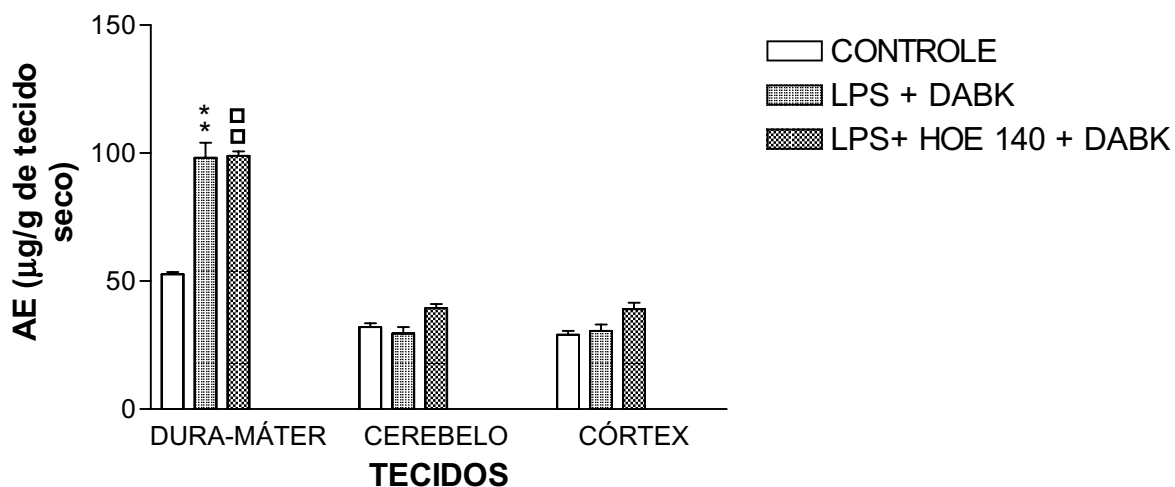


FIGURA 13 - Efeito do pré-tratamento de com o LPS (100 µg/Kg, i.v.) com DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) isoladamente ou em presença do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de rato. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença estatisticamente significativa do efeito das doses de LPS e DABK em relação ao grupo controle.

□□ $p < 0,01$ indica a diferença estatisticamente significativa do efeito do HOE 140, sobre as doses de LPS e DABK, em relação ao grupo controle.

TABELA V – Efeito do pré-tratamento de LPS (100 µg/Kg, i.v.) com o DABK (0,3 nmol/Kg i.v.) isolado ou em presença do LDABK (1 nmol/Kg, i.v.) e do HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
DABK	88,6 ± 2,6 (n=20) **	29,2 ± 1,2 (n=26)	28,2 ± 1,1 (n=24)
LPS	90,2 ± 4,0 (n=15) **	29,7 ± 1,3 (n=24)	28,1 ± 1,2 (n=19)
LPS + DABK	98,2 ± 5,9 (n=11) **	26,9 ± 2,4 (n=10)	30,6 ± 2,5 (n=10)
LPS+LDABK+DABK	70,4 ± 1,9 (n=5) ♦♦	34,8 ± 3,9 (n=5)	34,5 ± 2,9 (n=5)
LPS+HOE140+DABK	98,9 ± 1,8 (n=5) □□	39,4 ± 1,6 (n=5)	39,1 ± 2,4 (n=5)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex de rato após a administração de DABK isoladamente ou em presença de LPS, e desta associação em presença de LDABK ou HOE 140. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações. ** p<0,01 indicam as diferenças significativas do efeito da dose de DABK (0,3 nmol/Kg i.v.), do LPS (100 µg/Kg i.v.), da DABK associada com o LPS em relação ao grupo controle.

♦♦p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do antagonista de receptores B₁, LDABK (1 nmol/Kg i.v.), sobre a associação entre o LPS e DABK, comparado com o extravasamento plasmático induzido pelo LPS+DABK.

□□p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do antagonista de receptores B₂, HOE 140 (10 nmol/Kg i.v.), sobre a associação de LPS e DABK, em relação ao grupo controle.

4.3. Efeito do captopril (CAP) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

A figura 14 mostra que a BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) aumentou o extravasamento plasmático apenas na dura-máter. A administração intravenosa de CAP, um inibidor da enzima conversora da angiotensina (10 nmol/Kg, i.v.), induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático de 41% na dura-máter em relação ao grupo controle, sem afetar o cerebelo e córtex. O pré-tratamento com CAP (10 minutos antes) não reduziu o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter (Fig. 14, Tab. VI).

O pré-tratamento (10 minutos) dos animais com HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.) antes da administração do CAP (10 nmol/Kg, i.v.), que foi administrado 10 minutos antes da injeção da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), não alterou significativamente o extravasamento plasmático na dura-máter quando comparado com o grupo pré-tratado com CAP + BK (Fig. 14, Tab. VI).

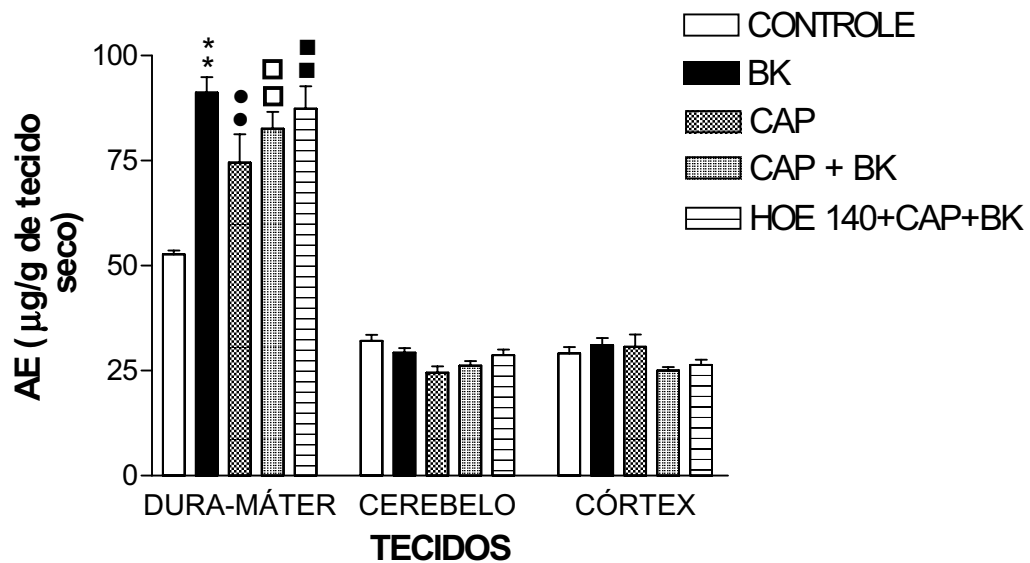


FIGURA 14 - Efeito da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), do CAP (10 nmol/Kg, i.v.), da associação entre eles antes e após o pré-tratamento com HOE 140 (10nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da BK em relação ao grupo controle.

●● $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do CAP em relação ao grupo controle.

$p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da BK associada ao CAP em relação ao grupo controle.

■■ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do antagonista B_2 , HOE 140, associado à dose de BK e de CAP comparado com o grupo controle.

TABELA VI – Efeito da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), CAP (10 nmol/Kg, i.v.) e de associação entre eles antes e após o pré-tratamento com o HOE 140 (10 nmol/Kg, i.v.) sobre o extravasamento plasmático na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
BK	91,2 ± 3,7 (n=12) **	29,3 ± 1,1 (n=20)	31,1 ± 1,7 (n=18)
CAP	74,5 ± 6,8 (n=7) **	24,5 ± 0,7 (n=11)	22,6 ± 1,5 (n=7)
CAP + BK	82,6 ± 4 (n=13) **	26,2 ± 1,1 (n=18)	25 ± 0,9 (n=11)
HOE 140+CAP+ BK	87,4 ± 5,3 (n=9) **	28,7 ± 1,3 (n=13)	26,4 ± 1,2 (n=10)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex de rato após a administração de BK e CAP isoladamente ou em associação, bem como a administração destes com o pré-tratamento com HOE 140. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações. Significância – ver Figura 14.

4.4. Efeito do antagonista de receptores NK₁ (RP 67580) sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

O antagonista seletivo para o receptor NK₁, RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.) não modificou o extravasamento plasmático em nenhum dos tecidos analisados (dura-máter, cerebelo e córtex), quando comparado com o grupo controle (Fig. 15, Tab. VII). O tratamento prévio dos animais com o RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da administração da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) reduziu significativamente em 100%, o extravasamento plasmático induzido por este peptídeo na dura-máter (Fig. 15, Tab. VII).

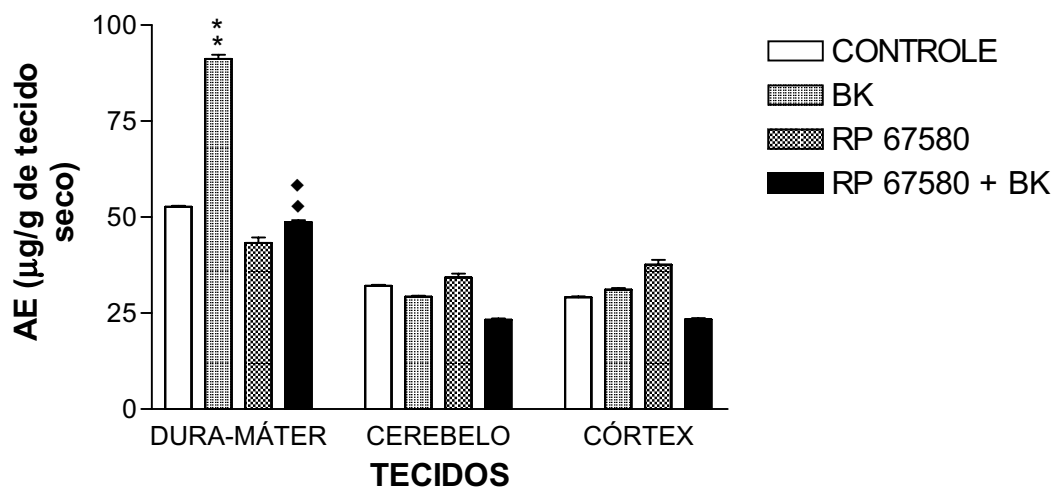


FIGURA 15 - Efeito da administração do RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença ,significativa do efeito da BK em relação ao grupo controle.

◆◆ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do RP 67580 + BK, comparado com a BK.

TABELA VII – Efeito da administração do RP 67580 (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
BK	91,2 ± 3,7 (n=12) **	29,3 ± 1,1 (n=20)	31,1 ± 1,7 (n=18)
RP 67580	43,3 ± 4,5 (n=10)	34,3 ± 3,2 (n=10)	37,6 ± 4,1 (n=10)
RP 67580 + BK	48,7 ± 1,4 (n=7) ♦♦	23,3 ± 0,9 (n=7)	23,4 ± 0,9 (n=7)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração de BK e RP 67580 isoladamente ou da BK em associação com RP 67580. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-Keuls para múltiplas comparações.

** p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da dose de BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) em relação ao grupo controle.

♦♦ p<0,01 indica a diferença significativa do efeito do pré-tratamento com o RP 67580, sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), comparado com o extravasamento plasmático induzido pela BK.

4.5. Efeito de um inibidor de NO sintase (L-NAME) sobre o extravasamento plasmático induzido por agonistas de receptores B₁ e B₂ na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos

O pré-tratamento dos animais com o inibidor da NO sintase, L-NAME (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da administração da BK (0,3 nmol/Kg, i.v.), não alterou o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter, no cerebelo e no córtex (Fig. 16, Tab. VIII).

No estudo com a DABK, o pré-tratamento com o L-NAME (10 nmol/Kg, i.v.), 10 minutos antes da administração da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.), não alterou o extravasamento plasmático induzido pela desArg⁹-BK na dura-máter (Fig. 17, Tab. VIII).

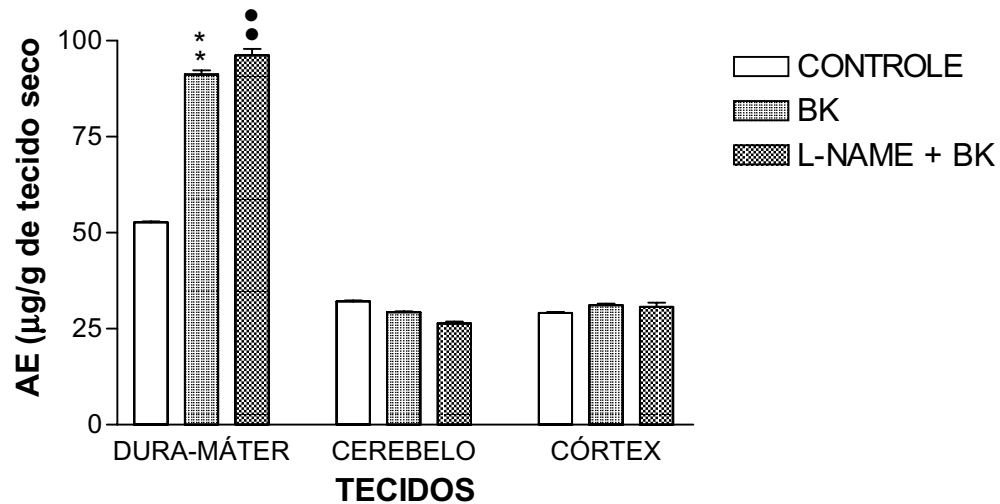


FIGURA 16 - Efeito do L-NAME (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da BK em relação ao grupo controle.

●● $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito do L-NAME + BK, comparado com o grupo controle.

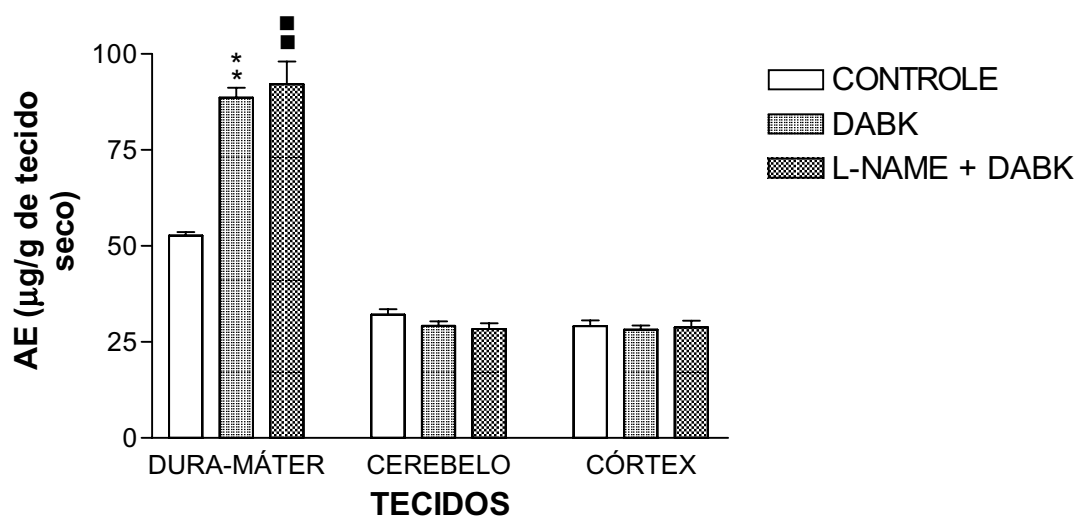


FIGURA 17 - Efeito do L-NAME (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos. As colunas indicam as médias e as barras verticais o erro padrão das médias.

** $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito da DABK em relação ao grupo controle.

■ $p < 0,01$ indica a diferença significativa do efeito L-NAME + DABK, comparado com o grupo controle.

TABELA VIII – Efeito da administração do L-NAME (10 nmol/Kg, i.v.), sobre o extravasamento plasmático induzido pela BK (0,3 nmol/Kg, i.v.) e da DABK (0,3 nmol/Kg, i.v.) na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos.

	DURA-MÁTER	CEREBELO	CÓRTEX
CONTROLE	52,7 ± 0,9 (n=17)	32,1 ± 1,4 (n=28)	29,1 ± 1,5 (n=23)
BK	91,2 ± 3,7 (n=12) **	29,3 ± 1,1 (n=20)	31,1 ± 1,7 (n=18)
L-NAME + BK	96,2 ± 5,1 (n=9) ●●	26,4 ± 1,5 (n=10)	30,7 ± 2,9 (n=7)
DABK	88,6 ± 2,6 (n=20) **	29,2 ± 1,2 (n=26)	28,2 ± 1,1 (n=24)
L-NAME + DABK	92,1 ± 5,9 (n=7) ■■	28,4 ± 1,5 (n=9)	28,8 ± 1,7 (n=8)

Valores médios ± erro padrão da média do extravasamento plasmático do azul de Evans em µg/g de tecido seco na dura-máter, cerebelo e córtex, após a administração da BK isoladamente ou em presença do L-NAME e da DABK isoladamente ou em presença de L-NAME. Os grupos experimentais foram comparados com o controle e avaliados pela análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste de post-hoc e Newman-keuls para múltiplas comparações. ** p<0,01 indicam as diferenças significativas do efeito das doses de BK e da DABK em relação ao grupo controle.

●● p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da dose de BK associada com o L-NAME em relação ao grupo controle.

■■ p<0,01 indica a diferença significativa do efeito da dose de DABK associada com o L-NAME em relação ao grupo controle.

5. Discussão

O extravasamento de proteínas ocorre diferentemente nos diversos tecidos. Na dura-máter e no sistema nervoso central, a estrutura dos capilares das meninges é diferente daquela encontrada no parênquima cerebral. No parênquima as células são unidas por junções íntimas que dificultam a passagem de macromoléculas para o meio extravascular, não existindo espaços intercelulares entre as células endoteliais adjacentes, portanto, com a ausência de poros (fenestrações), poucas vesículas pinocíticas e células não contráteis e ainda, os astrócitos possuem pés vasculares que fazem contato com os capilares cerebrais, corpos celulares, dendritos e axônios dos neurônios. Entretanto, na dura-máter verifica-se uma estrutura vascular apresentando um epitélio fenestrado, formando poros que se abrem e fecham, possibilitando a passagem de grandes moléculas de maneira mais fácil do que no parênquima cerebral (Vries *et al.*, 1997).

Segundo Steranka e Burch (1991), as cininas são poderosos agentes vasoativos na microcirculação, onde elas possuem ações no músculo liso ou células endoteliais de microvasos promovendo vasodilatação arteriolar e extravasamento plasmático. As cininas são liberadas a partir dos cininogênios, por clivagem de proteases chamadas de calicreínas e são catabolizadas por enzimas conhecidas como cininase II e endopeptidase neutra (NEP) (Skidgel *et al.*, 1987; Roques *et al.*, 1993). Células endoteliais vasculares possuem peptidases de superfície incluindo a NEP e a enzima conversora de angiotensina (ECA). Cininase II é também chamada de ECA, pois causa a conversão da angiotensina I no agente vasopressor angiotensina II.

As ações pró-inflamatórias das cininas são mediadas através da estimulação de seus dois tipos de receptores, B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980).

O mecanismo pelo qual a bradicinina (BK) induz o relaxamento da musculatura lisa vascular ocorre através de sua interação com os receptores B₂. Estes estão acoplados à proteína G e, deste modo sua estimulação desencadeia uma cascata de segundos mensageiros, incluindo a ativação de fosfolipase C (PLC) e fosfolipase A₂ (PLA₂), formando inositoltrifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), com aumento de AMP cíclico (AMPc) (Hall e Geppetti, 1995; Linz *et al.*, 1995; Bascands e Girolami, 1996).

Assim, a estimulação destes receptores provoca a ativação da enzima NO sintase endotelial (eNOS) constitutiva que regula a produção de óxido nítrico (NO) e induzem a produção de prostaciclina e outros prostanóides dependentes de ciclooxigenase, como o superóxido, ativa canais de K⁺ sensíveis à caribdotoxina e ainda, induz a formação do ácido epoxieicosatrienóico pelo citocromo P-450 epoxigenase (Bartha *et al.*, 1989; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Wiemer *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1996; Bagate *et al.*, 2001). Outro mecanismo de ação da BK é que ela possui efeito pró-inflamatório causando a formação de poros endoteliais, aumentando o extravasamento de proteínas; podendo induzir macrófagos a liberar mediadores que são quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos e monócitos; induzindo a adesão leucocitária ao endotélio venular pós-capilar (Majno *et al.*, 1969; Alexander *et al.*, 1988; D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; Roger *et al.*, 1990; Farmer *et al.*, 1991; Bhoola *et al.*, 1992; Mayhan, 1992; Green *et al.*, 1993; Cambridge e Brain, 1995; Feléton *et al.*, 1996; Rozsa *et al.*, 1998; Shigematsu *et al.*, 1999; Abbott, 2000;).

Em humanos, Berman *et al.* (1996) mostraram que a BK produz um aumento dose-dependente na resistência periférica basal das vias aéreas de asmáticos, mas não de sujeitos normais e induz o extravasamento plasmático no pulmão. Em um modelo animal mostrado por Erjefält e Persson (1991), a BK aumenta a permeabilidade vascular da mucosa traqueobrônquica de cobaias. Watanabe *et al.* (1999) mostraram que como mediador inflamatório, a BK é capaz de provocar o aumento do extravasamento plasmático via receptores B₂ nas células endoteliais das vias aéreas de cobaias.

Ensaio preliminares desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a administração endovenosa de BK aumentou o extravasamento plasmático de maneira dose-dependente na dura-máter de ratos (dados não publicados), no duodeno, pâncreas, traquéia e bexiga urinária (Nicolau *et al.*, 2003).

Neste estudo, os animais injetados com BK apresentaram um aumento do extravasamento plasmático apenas na dura-máter. No cerebelo e córtex não houve modificação no extravasamento plasmático. O efeito da BK foi inibido pelo antagonista B₂ (HOE 140), mas não pelo antagonista seletivo para receptores B₁ ([Leu⁸]desArg⁹-BK).

O HOE 140 é um potente, antagonista seletivo dos receptores B₂ de cininas, pois, não interage com receptores de outros peptídeos (SP, NKA) ou agentes não-peptídicos (NA, ACh). Este antagonista mostrou seletividade para B₂ em estudo feito sobre a contração de aorta de coelhos, onde o HOE 140 não afetou a resposta ao agonista seletivo de receptor B₁, desArg⁹-BK (DABK) (Rhaleb *et al.*, 1992).

Este efeito foi também observado por Bartus *et al.* (1996), sendo que a administração de HOE 140 aboliu completamente o fluxo de cálcio induzido por um agonista de receptor B₂, o RMP-7, em ratos. Rhaleb *et al.* (1992) mostraram que o HOE 140 antagonizou o efeito causado pela BK na traquéia de cobaia. Ainda, Tomoda *et al.* (1996) mostraram que numa série de experimentos para determinar a dose de HOE 140 que poderia antagonizar os efeitos cardiovasculares da BK exógena por um período de poucas horas, seria a dose de 10µg/kg, pois aboliu completamente a resposta depressora de 1µg/kg da BK. Além disto, o HOE 140 foi capaz de inibir respostas hiperalgésicas causadas pela BK injetadas em ratos Wistar (Poole *et al.*, 1999). O pré-tratamento com HOE 140 preveniu o aumento do rolamento, da adesão e da migração leucocitária e o extravasamento plasmático induzido pela BK no mesentério intestinal de ratos (Shigematsu *et al.*, 2002). O HOE 140 também reduziu o extravasamento plasmático induzido pela BK em vários tecidos (duodeno, íleo, bexiga, traquéia e brônquios) de ratos (Wille *et al.*, 2001).

Neste trabalho o antagonista de receptores B₁, não bloqueou o aumento do extravasamento plasmático pela induzido pela BK na dura-máter de ratos. Também Matsukado *et al.* (1998) observaram que a injeção do [Leu⁸]desArg⁹-BK em ratos não inibiu o aumento da permeabilidade de microvasos tumorais estimulados pela BK.

Estes resultados sugerem que o aumento da permeabilidade na dura-máter de ratos induzido pela BK é mediado pelos receptores B₂.

Contudo não podemos esquecer, que a BK pode estimular terminais nervosos nociceptivos causando dor, sensibilização e liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP) e a neurocinina A (NKA) (Walker *et al.*, 1995).

A SP, liberada a partir das terminações nervosas sensoriais, liga-se preferencialmente ao receptor NK₁ na superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos induzindo à formação de espaços intercelulares no endotélio vascular, ocasionando desta forma o extravasamento plasmático (Eglezos *et al.*, 1991; Bowden *et al.*, 1994).

Maggi *et al.* (1995) mostrou que no trato respiratório (traquéia, brônquio principal e mucosa nasal) a SP aumenta a permeabilidade microvascular, resultando em extravasamento de proteínas plasmáticas dose-dependente. Mas, Markowitz *et al.* (1987), Hall e Geppetti (1995) e Harrison e Geppetti (2001) mostraram que a SP não aumentou o extravasamento plasmático no parênquima cerebral. Entretanto, Cyrino *et al.* (2002) mostraram que a administração intravenosa de SP induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático na dura-máter, não modificando o extravasamento plasmático no cerebelo e córtex, e que o pré-tratamento feito com um antagonista de receptores NK₁, o RP 67580, 15 minutos antes da administração de SP, reduziu significativamente este efeito na dura-máter, demonstrando que a ação da SP se dá sobre os receptores NK₁. Figini *et al.* (1997) mostraram que o extravasamento plasmático induzido pela BK em diferentes tecidos de camundongos foi devido à liberação de SP e NKA de terminais sensoriais nervosos e conseqüentemente a estimulação dos receptores NK₁.

Neste estudo, o pré-tratamento com o RP 67580, inibiu o extravasamento plasmático induzido pela administração de BK na dura-máter de ratos. Sugerindo, portanto, que o extravasamento plasmático na dura-máter de ratos pode estar sendo mediada através da estimulação direta dos receptores B₂, através da BK, ou a BK poderia estar estimulando neurônios sensoriais a liberarem SP, que levaria a um aumento no extravasamento plasmático.

De acordo com o que foi descrito anteriormente, a BK aumentou o extravasamento plasmático na dura-máter de ratos, porém, a BK na dose de 10 nmol/Kg (maior dose utilizada neste ensaio) não provocou aumento significativo no extravasamento plasmático, quando comparado ao grupo controle. Isto se deve possivelmente a uma diminuição na expressão dos receptores B₂, relacionada com a rápida dessensibilização do receptor sob a constante estimulação do agonista (Schanstra *et al.*, 1999). A dessensibilização do receptor B₂ tem sido observada *in vitro* numa variedade de tipos celulares, incluindo células mesangiais renais (Bascands *et al.*, 1993). Este fenômeno é também observado *in vivo* no rim de ratos, onde a dessensibilização envolve um seqüestro rápido do receptor (Praddaude *et al.*, 1995). A administração isolada de BK ou o seu análogo, RMP-7, um agonista B₂, aumentam os níveis de cálcio citosólico (Bartus *et al.*, 1996). Entretanto, quando administrados juntos, este aumento não foi observado, sugerindo uma dessensibilização devido a uma via mediada por receptores comuns que provocam o aumento no cálcio (Bartus *et al.*, 1996).

Estudos bioquímicos têm sugerido que a dessensibilização induzida pela BK envolve mudanças ao nível do receptor, além de alterações nas vias de segundos mensageiros envolvidos na transdução de sinal. Dados da literatura demonstram

que a incubação de BK em cultura de fibroblastos humanos por um intervalo de 5 a 10 minutos resulta em diminuição das respostas causadas pela BK. A redução dessas respostas parece estar relacionada com a inibição da formação de prostanoídes (Roscher *et al.*, 1984). Além disso, foi mostrado que a dessensibilização induzida pela BK em neurônios sensoriais, é mediada pela liberação de NO, que ativa a guanilato ciclase, promovendo aumento nos níveis intracelulares de GMP cíclico (GMPc) (McGehee *et al.*, 1992; Harvey e Burgess, 1993). É possível que a dessensibilização dos receptores B₂ esteja envolvida com a alteração da produção de IP₃, mediada pela ativação de uma proteína quinase sensível ao GMPc, através da produção NO (Bradley e Burgess, 1993; Rueff *et al.*, 1994). Porém, são poucas as evidências que comprovam a participação de AMPc na dessensibilização dos receptores B₂ (Rueff *et al.*, 1994). Sendo assim, a dessensibilização induzida pela BK parece envolver diretamente, a interferência com os sistemas efetores acoplados ao receptor B₂. Podendo haver ainda o envolvimento de processos de agregação, internalização ou redução do número de receptores (Roscher *et al.*, 1990; Munoz e Leeb-Lundberg, 1992; Wolsing e Rosenbaum, 1993).

Para verificação da indução do extravasamento plasmático mediado pela BK na dura-máter, cerebelo e córtex de ratos utilizamos ainda inibidores da ECA. Tendo em vista que a NEP e a ECA metabolizam taquicinas e que a inibição da atividade da NEP e da ECA mostrou potencializar os efeitos das cininas administradas exogenamente ou liberadas endogenamente das taquicinas (Bertrand *et al.*, 1993; Emanuelli *et al.*, 1998; Nadel 1991; Mizuno *et al.*, 1995; Erdös e Skidgel, 1987). Portanto, a inibição da ECA eleva os níveis de cininas com

conseqüentes efeitos inflamatórios, produzindo, em particular, vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular (Wilhelm, 1973; Murata *et al.*, 1995).

Em um estudo feito em camundongos, Emanuelli *et al.* (1998) mostraram que a administração aguda de captopril (CAP), um inibidor da ECA, aumentou o extravasamento do corante Azul de Evans nas vias aéreas, pâncreas e intestino. Mostrou ainda que o CAP inibe a ECA por 30 minutos, sendo um intervalo de tempo suficiente para aumentar significativamente a permeabilidade vascular. Em estudo feito em traquéia de ratos, a combinação de CAP e fosforamidon (inibidor de NEP) aumentou o extravasamento plasmático (Brokawe e White, 1994).

Cyrino *et al.* (2002) mostraram que a administração de CAP, 15 minutos antes da injeção de Azul de Evans, induziu um aumento significativo no extravasamento plasmático na dura-máter de ratos. Em outro trabalho, a administração de CAP potencializou o extravasamento produzido pela capsaicina (Petersson *et al.*, 1993), sugerindo que estes inibidores enzimáticos permitem o acúmulo de seus substratos (SP, BK).

Neste estudo, a administração isolada de CAP em ratos induziu um aumento significativo no extravasamento plasmático na dura-máter sem, no entanto, alterar o extravasamento plasmático no cerebelo e no córtex. Já, o pré-tratamento de CAP, 10 minutos antes da administração de BK, não alterou significativamente o extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter. Sendo que inibidores da ECA atenuam a formação de angiotensina II e levam cininas, como a BK, a se acumular por inibição de sua degradação (Linz *et al.*, 1995; Campbell, 1995). Este aumento na concentração de BK circulante pode ter dessensibilizado os receptores B₂ não alterando assim o extravasamento plasmático na dura-máter.

Segundo Bhoola *et al.* (1996), o CAP além do acúmulo de BK, permite ainda o acúmulo de outros mediadores que também são hidrolisados pela ECA, como: endotelinas, neurotensinas e SP, que poderiam estar modulando diretamente os efeitos pró-inflamatórios das cininas, como verificado por Campos (1997), que demonstrou que a co-injeção de outros mediadores inflamatórios (SP, PGE₂, PGI₂), é capaz de alterar o perfil da dessensibilização induzida pela BK.

No presente trabalho o tratamento feito com o HOE 140, 10 minutos antes da injeção do CAP, que foi administrado 10 minutos antes da injeção da BK, não foi eficaz em inibir o extravasamento plasmático na dura-máter causado pela associação de CAP com BK. Provavelmente o HOE 140 não bloqueou o extravasamento plasmático porque o CAP permite acúmulo de outros mediadores também hidrolisados pela ECA, principalmente a SP (Bhoola *et al.*, 1996). Um resultado parecido com este também visto em outra oportunidade por Vianna (2003), onde o tratamento prévio com HOE 140 aumentou a migração de neutrófilos e de células mononucleares para a cavidade pleural de ratos diabéticos-(STZ), que receberam injeção i.pl. de DABK, e este aumento continuou presente durante o bloqueio dos receptores B₁ com o antagonista R-715, sugerindo que este efeito exercido pelo HOE 140 neste modelo parece ser mediado por outros mecanismos independentes da ativação dos receptores B₁ e B₂. No entanto, este resultado difere do obtido por Emanuelli *et al.* (1998), onde a administração de HOE 140 bloqueou o extravasamento plasmático induzido pelo CAP mediado pela BK em camundongos.

Várias evidências sugerem que muitos dos efeitos das cininas tanto os mediados pela ativação de receptores B₂, quanto os mediados por receptores B₁,

ocorrem através da liberação de NO ou de substâncias relacionadas (Schlemper e Calixto, 1994; Nakamura *et al.*, 1996). Já foi descrito que o NO possui potente ação vasodilatadora na circulação bronquial e pode regular o fluxo sanguíneo nas vias aéreas (Barnes, 1992). Sendo então o NO capaz de induzir exsudação plasmática por aumento do fluxo sanguíneo para vênulas pós-capilares além de produzir edema nas vias aéreas.

Os agonistas B₂ e B₁, administrados intraarterialmente agem como vasodilatadores através da redução do tônus venoso, diminuindo assim, a resistência vascular periférica, através de um mecanismo envolvendo a musculatura lisa, mas não prostanoídes ou a geração de NO pelo endotélio (Gardiner *et al.*, 1990; Bjornstadostensen e Berg, 1994).

Nakano *et al.* (1996) e Matsukado *et al.* (1998), detectaram em seus estudos altos níveis de expressão de NO sintase neuronal em cultura e células RG2 intracerebrais, mas não em tecidos cerebrais normais. A forma endotelial da NO sintase, também é expresso em cultura de células de glioma RG2, a expressão de NO sintase endotelial em tumores foi detectado em níveis mais altos que em cérebros normais. Quando injetaram BK na carótida notaram aumento na permeabilidade nas microveias do tumor cerebral, mediadas pelo NO. E que na ausência de altos níveis de NO sintase, o cérebro normal pode ter uma resposta menor à permeabilidade para a BK em suas microveias.

Embora existam evidências sugerindo que certas ações das cininas, resultantes da ativação de receptores B₁ e B₂, são indiretamente mediados pela liberação de NO (Schlemper e Calixto, 1994; Vianna e Calixto, 1998), Ferreira *et al.* (2000), mostraram que o edema da pata do rato, envolvendo receptores B₁,

não depende da liberação de NO. Em outro estudo, a inibição da NO sintase através do L-NAME, não influenciou a emigração e a adesão leucocitária induzida pela BK, nem preveniu o aumento do número de rolamentos leucocitários causados pela BK no mesentério intestinal de ratos (Shigematsu *et al.*, 2002).

Segundo Nicolau *et al.* (1996), no que diz respeito aos efeitos vasodilatador e hipotensivo da BK e da Sar[D-Phe⁸]desArg⁹-BK (agonista de receptores B₁), ambos parecem ser independentes da geração de NO ou prostaglandinas, particularmente PGI₂.

No presente estudo, o pré-tratamento com L-NAME, 10 minutos antes da administração de BK, não alterou extravasamento plasmático na dura-máter de ratos. Portanto o extravasamento plasmático na dura-máter induzido pelo agonista de receptores B₂ neste estudo parece não ser mediado através do NO.

Como já descrito anteriormente, no cerebelo e no córtex dos animais analisados neste estudo, não houve modificação no extravasamento plasmático, o que pode indicar que a BK possui dificuldades em atravessar a barreira hematoencefálica.

Porém, alguns estudos mostram que a infusão de BK no lúmen da vasculatura cerebral pode permeabilizar a barreira hematoencefálica, facilitando a passagem de compostos para o sistema nervoso, os quais são normalmente excluídos por barreiras vasculares (Raymond *et al.*, 1986; Wall *et al.*, 1987; Inamura e Black, 1994; Nomura *et al.* 1994;). Bartus *et al* (1996) mostraram que a BK e seu análogo, RMP-7 (Labradimil), aumentam a permeabilidade vascular em tumores cerebrais e tecidos que estão próximos ao tumor mais do que em cérebros sadios.

Recentemente o agonista seletivo de receptores B₂, Cereport (também chamado de RMP-7), tem mostrado um aumento transitório na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Embora inicialmente desenvolvido para aumentar a permeabilidade vascular que alimenta um glioma, estudos recentes mostraram que o Cereport também aumenta a distribuição de agentes farmacológicos através de barreiras hematoencefálicas normais (sem tumor) (Borlongan e Emerich, 2003).

O não aumento no extravasamento plasmático nos tecidos do sistema nervoso central nos animais deste trabalho pode ter ocorrido porque como via de administração da BK foi utilizada a veia peniana dorsal e não a vasculatura cerebral. Como foi mostrado em ratos Wistar injetados com células de glioma, sendo que o tumor poderia facilitar a passagem de substâncias através da barreira hematoencefálica (Bartus *et al.*, 1996; Emerich *et al.*, 2001), ou então o tipo de marcador celular utilizado neste estudo pode ter influenciado neste resultado, posto que este é diferente dos marcadores utilizados nos trabalhos dos autores acima citados.

Quanto aos receptores B₁ de cininas, eles exibem uma alta afinidade para metabólitos da carboxipeptidase ativa que clivam BK formando a desArg⁹-bradicinina (DABK) e desArg¹⁰-calidina (DAKD) (Marceu *et al.*, 1998; McLean *et al.*, 2000). Alguns autores relatam que a carboxipeptidase é encontrada predominantemente ligada à membrana e é densamente distribuída, incluindo a microvasculatura (Erdös, 1990).

Assim como os receptores B₂, os receptores B₁ são acoplados à proteína G, e ativam primariamente a fosfolipase C, aumentando o turnover de fosfatidilinositol, como visto anteriormente. Segundos mensageiros formados por

enzimas dependentes de Ca^{2+} , tais como eNOS e PLA₂ citosólico, levam a formação de NO e eicosanóides mediados por receptores B₁ (Drummond e Cocks, 1995; Levesque *et al.*, 1995; Pruneau *et al.*, 1996; Marceau *et al.*, 1998). Uma característica importante dos receptores B₁ é que eles sofrem up-regulation (Marceau *et al.*, 1998).

Ligantes de receptores B₁ causam vasoconstrição de vasos sangüíneos como: aorta de coelho (Regoli *et al.*, 1977; Deblois *et al.*, 1992; Levesque *et al.*, 1993), veia mesentérica de coelho (Regoli *et al.*, 1978) e artéria e veia umbilical humana (Gobeil *et al.*, 1996; Sardi *et al.*, 1997; Abbas *et al.*, 1998; Meini *et al.*, 1999). Já a resposta vasodilatadora mediada por B₁ é um fenômeno dependente do endotélio como ocorre na artéria coronária de rato, boi e humanos (Drummond e Cocks, 1995) e artérias mesentérica e carótida de coelhos (Deblois e Marceau, 1987; Pruneau e Belichard, 1993). Foi mostrado que a vasodilatação mediada por receptor B₁ das artérias coronárias de ratos e mesentérica de coelho envolve a liberação de eicosanóides, em particular prostaciclina (McLean, 1999).

Esta diversidade funcional e no mecanismo da reatividade vascular mediada pelo receptor B₁ pode estar relacionada com a espécie e/ou variação regional, ou ainda, devido a diferenças na sensibilidade ao mediador vasodilatador. A dilatação arterial associada com a venoconstrição poderia aumentar a pressão hidrostática aumentando então o extravasamento de proteínas plasmáticas e os eventos inflamatórios associados (McLean *et al.*, 2000).

Ferreira *et al.* (2002) mostraram que a injeção intratecal de DABK ou DAKD em camundongos resultou numa hiperalgesia térmica dose-dependente, medida no teste da placa quente.

Em camundongos knock-out de receptor B_1 não mostraram aumento da contratilidade do estômago na presença de DABK (Marceau *et al.*, 1998).

Resultados preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que a injeção intravenosa de DABK aumenta significativamente o extravasamento plasmático na dura-máter de ratos (dados não publicados).

Neste estudo, a administração intravenosa de DABK induziu um aumento no extravasamento plasmático na dura-máter, não afetando o extravasamento no cerebelo e no córtex. Verificou-se também, que a maior dose de DABK não alterou de forma significativa o extravasamento plasmático nos tecidos analisados. Assim como os receptores B_2 podem ser dessensibilizados com altas concentrações de BK, os receptores B_1 também poderiam ser dessensibilizados e internalizados em altas concentrações de DABK. Faussner *et al.* (1999), observaram que em culturas de células ocorreu dessensibilização e down-regulation dos receptores B_2 e apenas dessensibilização parcial dos receptores B_1 , possivelmente pelo fato de que apenas os receptores B_2 são constitutivos, enquanto os receptores B_1 foram induzidos.

Os receptores B_1 não são comumente expressos em condições fisiológicas normais, mas podem ser induzidos durante uma inflamação (Hayashi *et al.*, 2002). Trabalhos recentes, entretanto, tem revisado este conceito. Marceau *et al.* (1995), admite a existência de uma população basal de receptores B_1 que tem o seu número aumentado em artérias de coelho, tecidos de rato, cão, porco e cólon humano. Nakhostine *et al.* (1993), também observaram a presença de receptores B_1 constitutivos na artéria aorta de cão.

Em um modelo proposto por Vianna e Calixto (1998), a injeção intratorácica de desArg⁹-BK produziu uma resposta inflamatória caracterizada por extravasamento de proteínas plasmáticas e acumulação de leucócitos em animais sem tratamento prévio, sugerindo a presença de receptores B₁ constitutivos em camundongos. Recentes estudos imunohistoquímicos sugerem que receptores B₁ podem ser constitutivamente expressos em neurônios sensoriais periféricos de ratos (Wotherspohn e Winter, 2000; Ma *et al.*, 2000). O mRNA do receptor B₁ foi detectado por RT-PCR nos gânglios da raiz dorsal de camundongos, ratos e humanos (Seabrook *et al.*, 1997; Levy e Zochodne, 2000; Ma e Heavens, 2001). Ma e Heavens (2001) mostraram que em ratos há uma densa marcação de receptores B₁ constitutivos no corno dorsal da medula espinhal, que aparece nos terminais centrais de aferentes primários ou de dendritos e terminais axonais de neurônios espinhais. No corno dorsal da medula espinhal, a marcação de receptor B₁ foi encontrada nas lamínas 1 e 2 (predominantemente) (Wotherspohn e Winter, 2000). No Sistema Nervoso Central de humanos, Raidoo e Bhoola (1997) encontraram receptores B₁ constitutivos no tálamo e hipotálamo. O aumento do extravasamento plasmático após a administração do agonista B₁ e o bloqueio desta resposta pelo antagonista B₁, permitem supor que na dura-máter de ratos, os receptores B₁ estariam expressos constitutivamente. Essa suposição pode ser feita, tendo por base alguns resultados que serão discutidos a seguir.

O pré-tratamento (10 minutos) com [Leu]⁸desArg⁹-BK, um antagonista seletivo para o receptor B₁ (Regoli e Barabé, 1980), inibiu o extravasamento plasmático na dura-máter, em resposta à injeção i.v. de DABK. Ao contrário o pré-tratamento (10 minutos) dos animais com o antagonista seletivo para os

receptores B₂, o HOE 140, não foi capaz de interferir de maneira significativa com o extravasamento plasmático causado pela DABK na dura-máter de ratos.

Os dados deste estudo indicam que o extravasamento plasmático na dura-máter de ratos também é mediado via receptor B₁ sendo seletivamente antagonizado por [Leu]⁸des Arg⁹-BK. Estes resultados estão de acordo com Siebeck *et al.* (1998), que mostraram que a resposta a DABK em porcos não foi bloqueada pelo antagonista seletivo B₂, HOE 140, enquanto que o trabalho de Regoli *et al.* (1977) mostrou que o [Leu]⁸des Arg⁹-BK é seletivo para receptor B₁.

Em um estudo feito por Drummond e Cocks (1995) mostraram que preparações de anel de artérias coronárias desenvolvem com o tempo a capacidade de responder a DABK resultando num relaxamento dependente do endotélio que foi competitivamente antagonizado por [Leu]⁸des-Arg⁹-BK, mas não por HOE 140. Regoli *et al.* (1981) e McLean *et al.* (1999) mostraram que a administração de antagonistas de receptores B₁ bloqueiam os efeitos hipotensivos de agonistas de receptores B₁ administrados exogenamente.

Outro estudo mostrou que o acúmulo de leucócitos usando um modelo animal é parcialmente prevenida por [Leu]⁸des-Arg⁹-BK, mas não por HOE 140 (Ahluwalia e Perreti, 1996).

Por outro lado, não podemos descartar também a possibilidade do agonista B₁ ter provocado a liberação de SP com conseqüente aumento do efeito em estudo. Uma vez que já foi mostrado ser possível bloquear a resposta do agonista B₁ por antagonistas de receptores NK₁ (Ma *et al.*, 2000; Pesquero *et al.*, 2000; Vianna e Calixto, 1998).

A indução dos receptores B₁ tem sido descrita em várias preparações de musculatura lisa, em resposta ao dano tecidual produzido pela incubação *in vitro*, ou ainda pela adição de várias substâncias, como citocinas e produtos bacterianos (Marceau *et al.*, 1998; Sardi *et al.*, 2000). O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), maior constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas, pode interagir com células inflamatórias e endoteliais e está presente em uma grande variedade de ambientes e isso implica em muitas doenças inflamatórias. O LPS induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, sendo que alguns deles, como histamina, BK e prostaglandina, têm mostrado aumentarem a quimiosensibilidade bronquiopulmonar das fibras C (Kaufman *et al.*, 1980; Lee e Morton, 1993; 1995), além de potencializar os níveis de expressão dos receptores B₁ (Parrat, 1994; Marceau, 1995). Vários grupos têm usado a administração de LPS sistêmico como modelo de infecção e inflamação. A inalação do LPS causa broncoconstrição no homem (Jamison e Lowry, 1986), e ainda pode resultar em uma resposta inflamatória, incluindo infiltração leucocitária, edema e aumento da permeabilidade vascular (Hudson *et al.*, 1997; Pauwels *et al.*, 1990; Esbenschade *et al.*, 1982), também exerce um papel no agravamento da asma (Hutchison *et al.*, 1983), na patogênese do edema pulmonar e injúria pulmonar *in vitro* quando uma grande dose de LPS é administrada (Harlar *et al.*, 1983).

A Injeção de LPS sistêmico mostrou induzir mudanças na pressão sanguínea, osmolaridade, dor, consumo de oxigênio, febre, metabolismo energético, falência de múltiplos órgãos e diferentes mudanças no sistema endócrino, assim como ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Lacroix *et al.*, 1998).

No trabalho de Andersson *et al.* (1992), verificou-se que quando administrado centralmente, o LPS (0,02-150 µg i.c.v.), mostrou induzir respostas inflamatórias agudas nos ventrículos, plexos coróides e espaço subaracnóideo.

Em estudos realizados previamente no nosso laboratório foi observado que a injeção de LPS provocou um aumento no extravasamento plasmático na bexiga urinária de ratos (Wille *et al.*, 2001), e também um aumento no extravasamento plasmático na dura-máter (dados não publicados).

No presente estudo, o pré-tratamento com LPS, 24 horas antes da injeção do corante azul de Evans, induziu um aumento significativo do extravasamento plasmático na dura-máter de ratos, mas sem alterar o extravasamento plasmático basal no cerebelo e no córtex. A administração DABK, em um grupo pré-tratado com LPS, não alterou significativamente o aumento no extravasamento plasmático na dura-máter quando comparado com os animais tratados somente com DABK. O extravasamento plasmático na dura-máter induzido pela associação entre o LPS e o agonista B₁ foi bloqueado pelo antagonista de receptores B₁, [Leu]⁸des-Arg⁹-BK, mas não pelo antagonista de receptores B₂, HOE 140. Segundo Wille *et al.* (2001) o tratamento com LPS potencializou o efeito do agonista B₁ utilizado, no duodeno, íleo, traquéia e brônquios, que foi bloqueado pelo antagonista B₁, mas não pelo antagonista B₂, estando de acordo com este estudo.

Este é outro resultado que reforça a sugestão da presença do receptor B₁ na sua forma constitutiva, na dura-máter de ratos, pois, a injeção i.v. de DABK causou a mesma resposta inflamatória nos animais que foram pré-tratados com LPS.

No presente estudo, foi verificada também se ocorre a participação do NO, no aumento do extravasamento plasmático na dura-máter de ratos mediada por um agonista de receptores B₁, o DABK. Assim como na resposta observada no extravasamento plasmático induzido pela BK, quando realizado o pré-tratamento com L-NAME, 10 minutos antes da administração de DABK, não observou-se alteração no extravasamento plasmático na dura-máter de ratos. Portanto o extravasamento plasmático na dura-máter induzido pelo agonista de receptores B₁, assim como o induzido pelo agonista de receptores B₂, parece não ser mediado através do NO.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo permitiram demonstrar que os agonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂, (DABK e BK, respectivamente), quando injetados por via i.v. em ratos aumentam o extravasamento plasmático na dura-máter, isto foi possível graças ao uso de agonistas e antagonistas seletivos. Porém, não foram verificados aumento no extravasamento plasmático no cerebelo e no córtex, com nenhuma das doses das cininas utilizadas. Confirmando, portanto que a barreira hematoencefálica limita o acesso de substâncias ao parênquima cerebral.

Observou-se que a administração de doses sub-letais de LPS provoca o aumento no extravasamento plasmático na dura-máter. Entretanto, não foi observada indução de receptores B₁ nos animais pré-tratados com esta toxina e injetados com o agonista B₁, sugerindo que o efeito da DABK foi independente do pré-tratamento com LPS.

Além disso, verificou-se que a administração da BK pode mediar a liberação de SP, isso pode ser avaliado, através da utilização do antagonista seletivo de

receptores NK_1 , o RP 67580, que bloqueou o aumento no extravasamento plasmático induzido pela BK na dura-máter de ratos. Sugerindo então, que a BK pode aumentar o extravasamento plasmático na dura-máter tanto pela ativação direta dos receptores B_2 , quanto pela estimulação de neurônios sensoriais que liberam SP. Ficou demonstrado também, que o pré-tratamento com L-NAME, não alterou o extravasamento plasmático induzido pelos agonistas de receptores B_1 e B_2 na dura-máter de ratos. Mostrando que neste estudo do extravasamento plasmático na dura-máter parece não estar havendo participação direta do NO. Já a administração isolada de CAP induziu um aumento no extravasamento plasmático na dura-máter de ratos, porém em animais pré-tratados com CAP e que em seguida foi administrada a BK, não foi verificada alteração significativa no extravasamento plasmático na dura-máter, quando comparado ao grupo tratado somente com BK.

Seria necessária a realização de mais estudos, para verificação de uma possível estimulação da liberação de SP, por parte da DABK, como ficou demonstrado no grupo tratado com BK e inibido com o RP 67580. Além disso, verificou-se a necessidade de mais grupos experimentais com animais pré-tratados com LPS em associação a diferentes doses de DABK, para verificar um possível aumento na expressão de receptores B_1 , por parte do LPS.

E em experimentos futuros seria interessante a realização de estudos de biologia molecular para caracterização da expressão dos receptores B_1 na dura-máter de ratos, através da utilização de técnicas como o PCR.

6. Referências Bibliográficas

- ABBAS, F.; CLAYTON, J. K.; MARSHALL, K. M.; SENIOR, J. **Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery.** *J. Endocrinol.* 156: 389-94, 1998.
- ABBOT, N. J. **Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability.** *Cell. Mol. Neurobiol.* 20: 131-147, 2000.
- AHLUWALIA, A.; PERRETI, M. **Calcitonin gene-related peptide modulate the acute inflammatory response unduced by interleukin-1 in the mouse.** *Eur. J. Pharmacol.* 264: 407-415, 1994.
- AHLUWALIA, A.; PERRETI, M. **Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta *in vivo* in the mouse.** *J. Immunol.* 156: 269-274, 1996.
- ALEXANDER, J. S.; HECHTMAN, H. B.; SHEPR, D. **Phalloidin enhances endothelial barrier function and reduces inflammatory permeability in vitro.** *Microvasc. Res.* 35: 308-315, 1988.
- ANDERSSON, P. B.; PERRY, V. H.; GORDON, S. **The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues.** *Neuroscience.* 48: 169-86, 1992.
- ARMSTRONG, D.; JEPSON, J. B.; KEELE, G. S. and STEWART, J. W. – **Development of pain – producing substance in human plasma.** *Nature.* 174: 791-792, 1954.
- ARMSTRONG, D. **Pain.** Cap. 1. In: ERDÖS, E. G. (Ed.). *Handb. Exp. Pharmacol.* Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. Berlim: Springer-Verlag. 25: 435-481, 1970.
- ASANO, M.; HATORI, C.; INAMURA, N.; SAWAI, H.; HIROSUMI, J.; FUJIWARA, T.; NAKAHARA, K. **Effects of a nonpeptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR 167344, on different *in vivo* animals models of inflammation.** *Br. J. Pharmacol.* 122: 1436-1440, 1997.

AUSTIN, K. E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H. E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D. J.; BATHON, J. M.; PROUD, D. **Stable expression of the human kinin B₁ receptor in Chinese hamster ovary cells.** *J. Biol. Chem.* 272: 11420-11425, 1997.

BAGATE, K.; GRIMA, M.; IMBS, J. L.; JONG, W. D.; HELWIG, J. J.; BARTHELMEBS, M. **Signal transduction pathways involved in kinin B₂ receptor – mediated vasodilation in rat isolated perfused kidney.** *Br. J. Pharmacol.* 132: 1735-1752, 2001.

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

BARTHA, K.; MULLER-PEDDINGHAUS, R.; VAN ROOIJEN, L. A. **Bradykinin and thrombin effects on polyphosphoinositide hydrolysis and prostacyclin production in endothelial cells.** *Biochem. J.* 1; 263: 149-55, 1989.

BARTUS, R.T.; ELLIOT, P.; HAIARD, N.; DEAN, R.; McEWEN, EL.; FISHER, S. K. **Permeability of the blood brain barrier by the bradykinin agonist, RMP-7: evidence for a sensitive, auto-regulated, receptor – mediated system.** *Immunopharmacology.* 33: 270-278, 1996.

BASCANDS, J. L.; PECHER, C.; ROUAUD, S.; EMOND, C.; TACK, J. L.; BASTIE, M. J.; BURCH, R.; REGOLI, D.; GIROLAMI, J. P. **Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesogial cells.** *Am. J. Physiol.* 264: F548-556, 1993.

BASCANDS, J. L.; GIROLAMI, J. P. **La bradykinine.** *Med. Sci.* 12: 582-592, 1996.

BERMAN, A. R.; LIU, M. C.; WAGNER, E. M.; PROUD, D. **Dissociation of bradykinin-induced plasma exudation and reactivity in the peripheral airways.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 418-23, 1996.

- BESSION, J. M. **The neurobiology of pain.** *Lancet.* 353: 1610-1615, 1999.
- BETZ, A. L. **An overview of the multiple functions of the blood – brain barrier.** *NIDA Res. Monogr.* 120: 54-72, 1992.
- BHOOLA, K. D., FIGUEROA, C. D., WORTHY, K. **Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens and kininases.** *Pharmacol. Rev.* 44: 1-80, 1992.
- BHOOLA, K. D. **Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation.** *Immunopharmacology.* 33: 247-156, 1996.
- BJORNSTADOSTENSEN, A.; BERG, T. **The role of nitric oxide, adrenergic activation and kinin-degradation in blood pressure homeostasis following an acute kinin-induced hypotension.** *Br. J. Pharmacol.* 113:1567-1573, 1994.
- BLAIS, C. Jr.; COUTURE, R.; DRAPEAU, G.; COLMAN, R. W.; ADAM, A. **Involvement of endogenous kinin in the pathogenesis of peptidoglycan – induced arthritis in the Lewis rat.** *Arthritis Rheum.* 40: 7, 1997.
- BOISSONAS, R. A. et al. **Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin.** *Experientia.* 16: 326, 1960.
- BORLONGAN, C. V.; EMERICH, D. F. **Facilitation of drug entry into in the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport.** *Brain Res. Bull.* 60: 297-306, 2003.
- BOWDEN, J. J.; GARLAND, A. M.; BALUK, P. **Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK-1) receptors at sites of inflammation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8964-8968, 1994.
- BRADLEY, C.; BURGUESS, G. **A nitric oxide synthases inhibitor reduces desensitization of bradykinin-induced activation of phospholipase C in sensory neurons.** *Trans. Biochem. Soc.* 21: 4353, 1993.

- BRIGHTMAN, M. W.; KADOTA, Y. **Nonpermeable and permeable vessels of the brain.** *Res. Monogr.* 120:87-107, 1992
- BROKAW, J. J.; WHITE, G. W. **Differential effects of phosphoramidon and captopril on NK1 receptor-mediated plasma extravasation in the rat trachea.** *Agents Actions.* 42: 34-9, 1994.
- BURCH, R. M.; DeHASS, C. **A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 189-193, 1990.
- BUTT, S. K.; DOWSON, L. G.; HALL, J. M. **Bradykinin B₁ receptors in the rabbit urinary bladder: Induction of responses, smooth muscle contraction and phosphatidylinositol hydrolysis.** *Br. J. Pharmacol.* 114: 612-617, 1995.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. **Kinins in pain and inflammation.** *Pain.* 87: 1-5. 2000.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. **Inflammatory pain: kinins and antagonists.** *Curr. Opin. Anesthesiol.* 14: 519-526, 2001.
- CAMBRIDGE, H.; BRAIN, S. D. **Mechanisms of bradykinin – induced plasma extravasation in the rat knee joint.** *Br. J. Pharmacol.* 115: 641-647, 1995.
- CAMPBELL, D. J.; LAWRENCE, A. C; KLADIS, A.; DUNCAN, A-M. **Strategies for measurement of angiotensin and bradykinin peptides and their metabolites in Central Nervous System and others tissues.** *Methods in Neurosci.* 23: 328-343, 1995.
- CAMPOS, M. M. **Mecanismos envolvidos nas respostas edematogênicas mediadas pela ativação de receptores B₁ e B₂ para as cininas na pata de rato.** Tese de Mestrado apresentada à PG de Farmacologia, UFSC, Florianópolis. 1997.
- CAMPOS, M. M. **Mecanismos envolvidos no efeito modulatório de citocinas pró-inflamatórias sobre as respostas mediadas pelos receptores B₁ e B₂ para as cininas na pata de rato.** Tese de Doutorado apresentada à PG de Farmacologia, UFSC, Florianópolis. 2001.

- CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. **Neurokinin mediation of edema and inflammation.** *Neuropeptides* 34: 314-322, 2000.
- CAMPOS, M. M.; HENRIQUES, M. G. M. O.; CALIXTO, J. B. **The role of B₁ and B₂ kinin receptors in oedema formation after long-term treatment with mycobacterium bovis bacillus Calmette – Guírin (BCG).** *Br. J. Pharmacol.* 120: 502-508, 1997.
- COLLIER, H. O. J.; HOLGATE, J. A.; SCHACHTER, M.; SHORLEY, P. G. **The bronchoconstrictor action of bradykinin in the guinea pig.** *Brit. J. Pharmacol.* 15: 290-197, 1960.
- COLLIER, H. O. J.; SHORLEY, P. G. **Antagonism by mefenamic and flufenamic acids of the bronchoconstrictor action of kinins in the guinea pig.** *Brit. J. Pharmacol.* 20: 345-352, 1963.
- COLMAN, R. W.; WONG, P. Y.; TALAMAO, R. C. **Kallikrein – kinin system in carcinopid and postgastretomy dumping syndromes.** In *Forgaty International Center Proceedings.* 27: 487-494, 1976.
- CORREA, F. M. A.; GRAEFF, F. G. **Central mechanisms of the hypertensive action of intraventricular bradykinin in the unanesthetized rat.** *Neuropharmacology.* 13: 65-75, 1974.
- CORREA, F. M. A.; GRAEFF, F. G. **On mechanism of the hypertensive action of intraseptal bradykinin in the rat.** *Neuropharmacology.* 15: 713-717, 1976.
- COURREA, F. M. A.; INNIS, R. B.; UHL, G. R.; SNYDER, S. H. **Bradykinin like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1489-1493, 1979.
- COUTURE, R.; LINDSEY, C. J. **Brain kallikrein-kinin system from receptors to neuronal pathways and physiological functions.** In: Quirion, R., Björklund, A.; Hökfeld, T. (Ed.) *Handbook of chemical anatomy.* Vol. 16: Peptide receptors, part 1. Elsevier. The Netherland, pp. 241-298, 2000.
- COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. **Kinin receptors in pain and inflammation.** *Eur. J. Pharmacol.* 429: 161-176, 2001.

- CRYWS, S. C.; GARRETT, N. E.; PERKINS, M. N.; BLAKE, D. R.; KIDD, B. L. **The role of bradykinin B₁ receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis.** *Br. J. Pharmacol.* 113: 940-4, 1994.
- CYRINO, L. A. R.; CARDOSO, R. C. F.; HACKL, L. P. N.; NICOLAU, M. **Effect of quercetin on plasma extravasation in rat CNS and dura mater by ACE and NEP inhibition.** *Phytotherapy Res.* 16: 545-549, 2002.
- DALE, M. M.; FOREMAN, J. C.; FANT-P. **Textbook of immunopharmacology.** 3rd ed. Blawell Scientific Publication, Oxford. 1994.
- DeBLOIS, D.; MARCEAU, F. **The ability of desArg⁹-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired during in vitro incubation.** *Eur. J. Pharmacol.* 142: 141-4, 1987.
- DeBLOIS, D.; DRAPEAU, G.; PETITCLERC, E.; MARCEAU, F. **Synergism between the contractile effect of epidermal growth factor and that of des-Arg⁹-bradykinin or of alpha-thrombin in rabbit aortic rings.** *Br. J. Pharmacol.* 105: 959-67, 1992.
- DeBLOIS, D.; HORLICK, R. A. **Endotoxin sensitization to kinin B₁ receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects.** *Br. J. Pharmacol.* 132: 327-335, 2001.
- DÉCARIE, A.; RAYMOND, P.; GERVAIS, N.; COUTURE, R.; ADAM, A. **Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [desArg⁹]BK: influence of enalaprelat.** *Am. J. Physiol.* 270: H1340-H1347, 1996.
- D' ORLEANS – JUSTE, P.; de NUCCI, G.; VANE, J. R. **Kinins act on B₁ or B₂ receptors to release conjointly endothelium – derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells.** *Br. J. Pharmacol.* 96: 920-926, 1989.
- DRAY, A. **Kinins and their receptors in hyperalgesia.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 704-712, 1997.

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

DRAY, A.; PERKINS, M. N. **Kinin and pain.** In: Farmer, S. (Ed.), *The Kinin System.* Academic Press, San Diego. 157-172, 1997.

DRENCKHAHN, D.; WAGNER, J. **Stress fibres in the splenic endothelium in situ: Molecular structure, relationship to the extracellular matrix and contractibility.** *J. Cell. Biol.* 102: 1738-1747, 1986.

DRUMMOND, G. R.; COCKS, T. M. **Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B₁ and constitutive B₂ kinin receptors in the isolated coronary artery.** *Br. J. Pharmacol.* 116: 2473-2481, 1995.

EGLEZOS, A.; GIULIANI, S.; VITI, G.; MAGGI, C. A. **Direct evidence that capsaicin-induced plasma protein extravasation is mediated through tachykinin NK-1 receptors.** *Eur. J. Pharmacol.*, 209: 277-279, 1991.

EISEN, V. **Formation and functions of kinins.** *Rheumatology.* 3: 103-168, 1970.

ELLIOT, D. F.; HORNTON, E. W.; LEWIS, G. P. **Actions of pure bradykinin.** *J. Physiol.* 153: 474-480, 1960.

EMANNUELI, C.; GRADY, E. F.; FIGINI, M.; BUNNETT, N. W.; PARISI, D.; REGOLI, D.; GEPPETTI, P. **Acute ACE inhibitors causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P.** *Hypertension.* 31: 1299-1304, 1998.

EMERICH, D. F.; DEAN, R. L.; OSBORN, C.; BARTUS, R. T. **The development of the bradykinin agonist Labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier from concept to clinical evaluation.** *Clin. Pharmacokinet.* 40: 105-123, 2001.

ERDOS, E. G.; SKIDGEL, R. A. **The angiotensin I-converting enzyme.** *Lab. Invest.* 56: 345-8, 1987.

- ERDOS, E. G. **Some old and some new ideas on kinin metabolism.** *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 : 520-524, 1990.
- ERJEFALT, I.; PERSSON, C. G. **Allergen, bradykinin, and capsaicin increase outward but not inward macromolecular permeability of guinea-pig tracheobronchial mucosa.** *Clin. Exp. Allergy.* 21: 217-24, 1991.
- ESBENSHADE, A. M.; NEWMAN, J. H.; LAMS, P. M.; JOLLES, H.; BRIGHAM, K. L. **Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance.** *Appl. Physiol.* 53: 967-76, 1982.
- FARMER, S. G., BURCH, R. M. **The pharmacology of bradykinin receptors.** In: *Basic and Clinical Res.* edited by R. M. Burch. New York: Dekker. 1-31, 1991.
- FAUSSNER, A.; PROUD, D.; TOWNS, M.; BATHON, J. **Influence of the cytosolic carboxy termini of B₁ and B₂ kinin receptors on ligand internalization.** *Presented at the International Multidisciplinary Symposium on Peptide Receptors*, Montreal, Canada, July 28 – August 1, 1996.
- FAUSSNER, A.; BATHON, J. M.; PROUD, D. **Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation.** *Immunopharmacology.* 45: 13-20, 1999.
- FÉLÉTON, M.; BONNARDEL, E.; CANET, E. **Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide.** *Br. J. Pharmacol.* 118: 1371-1376, 1996.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; CALIXTO, J. B. **The use of kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level.** *Neuropharmacology.* 43: 1188-1197, 2002.
- FERREIRA, P. K.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. **The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B₁ agonist des-Arg⁹-BK in rats pre-treated with LPS.** *Regulatory Peptides.* 89: 29-35, 2000.

- FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. – **The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of cat.** *Br. J. Pharmacol.* 30:417-424, 1967.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. **Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia.** *Br. J. Pharmacol.* 110: 1227-1231, 1993.
- FIGINI, M.; EMANUELI, C.; GRADY, E. F.; KIRKWOOD, K.; PAYAN, D. G.; ANSEL, J.; GERARD, C.; GEPPETTI, P.; BUNNETT, N. **Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas.** *Am. J. Physiol.*, 272, G785-G793, 1997.
- FLEMING, I.; BAUERSACHS, J.; BUSSE, R. **Paracrine functions of the coronary vascular endothelium.** *Mol. Cell. Biochem.* 157: 137-145, 1996.
- FULTON, D.; MAHBOUBI, K.; MCGIFF, J. C.; QUILLEY, J. **Cytochrome P450-dependent effects of bradykinin in the rat heart.** *Br. J. Pharmacol.* 114: 99-102, 1995.
- GAINER, J. V.; MORROW, J. D.; LOVELAND, A.; KING, D. J.; BROWN, N. J. **Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects** *New. Engl. J. Med.* 339: 1285-92, 1998.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; BENNETT, T. **Regional and cardiac haemodynamic response to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester.** *Br. J. Pharmacol.* 101: 632-639, 1990.
- GOBEIL, F.; PHENG, L. H.; BADINI, I.; NGUYEN-LE, X. K.; PIZARD, A.; RIZZI, A.; BLOUIN, D.; REGOLI, D. **Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein.** *Br. J. Pharmacol.* 118: 289-94, 1996.
- GOLDSTEIN, G. W.; BETZ, A. L. **Recent advances in understanding brain capillary function.** *Ann. Neurol.* 14: 389-195, 1986.

- GORE, R. W.; McDONAGH, P. F. **Fluid exchange across single capillaries.** *Annu. Rev. Physiol.* 42: 337-357, 1980.
- GRAEFF, F. G.; ARIZAWA, E. A. **Effect of intracerebroventricular bradykinin, angiotensin II, and substance P on multiple fixed – interval fixed – ratio responding in rabbits.** *Psychopharmacology.* 57: 89-95, 1978.
- GREEN, P.G.; LUO, J.; HELLER, P.H.; LEVINE, J. D. **Neurogenic and non-neurogenic mechanism of plasma extravasation in the rat.** *Neuroscience.* 52: 735-743, 1993.
- GRIESBACHER, T.; LEGAT, F. J. **Effects of FR173657, A non-peptide B₂ antagonist, on kinin-induced hypotension, visceral and oedema formation and bronchoconstriction.** *Br. J. Pharmacol.* 120: 933-939, 1997.
- GRIESBACHER, T.; LEGAT, F. J. **Effects of the non-peptide B₂ receptor antagonist FR173657 in models of visceral and cutaneous inflammation.** *Inflammation Res.* 49: 535-540, 2000.
- HABERLAND, G. L.; BOHEN, J. W. - **Kininogenases – KalliKreins.** *Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rational* F.K; Schattarer, Stuttgart, 1973.
- HALL, J. M.; GEPPEI, P. **Kinins and kinins receptor in the nervous system.** *Neurochem. Int.* 26: 17-26, 1995.
- HALL, J. M. **Bradykinin receptors.** *Gen. Pharmacol.* 28: 1-6, 1997.
- HANSON, W. L.; McCULLOUGH, R. G.; SELIG, W. M.; WIECZOREK, M.; ROSS, S.; WHALLEY, E. T.; STEWART, J. M.; GERA, L. **In vivo pharmacological profile of novel, potent, stable BK antagonists at B₁ and B₂ receptors.** *Immunopharmacology.* 33: 191-193, 1996.
- HARLAR, L. M.; HARKER, L. A.; REIDER, M. A.; GAJDUSEK, C. M.; SCHWARTZ, S. M.; STRIKER, C. E. **Lipopolysaccharide mediated bovine endothelial cell injury *in vitro*.** *Lab. Invest.* 48: 269-274, 1983.

- HARRISON, S.; GEPPETI, P. **Substance P**. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 555-576, 2001.
- HARVEY, J. S.; BURGUESS, G. M. **A nitric oxide synthase inhibitor reduces desensitization of bradykinin-induced activation of phospholipase C in sensory neurons**. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 435S, 1993.
- HAYASHI, I.; AMANO, H.; ISHIHARA, K.; KUMAGAI, Y.; YOSHIMURA, H.; MAJIMA, M. **The role of kinin B₁ in the plasma extravasation of carrageenin – induced pleurisy**. *Life Sci.* 70: 937-949, 2002.
- HECQUET, C.; TAN, F.; MARCIC, B. M.; ERDÖS, E. G. **Human bradykinin B₂ receptor is activated by kallikrein and other serine proteases**. *Mol. Pharmacol.* 58: 828-836, 2000.
- HEITSCH, H. **Bradykinin B₂ receptor as a potential therapeutic target**. *Drug News Perspect.* 13: 213-25, 2000.
- HESS, J. F.; HEY, P. J.; CHEN, T. B.; PETTIBONE, D. J.; CHANG, R. S. L. **Molecular and pharmacological diversity of the kinin B₁ receptor**. *Int. Immunopharmacol* 2: 1747-1754, 2002.
- HILTON, S. M. – **The physiological role of glandular Kallikreins**. *Handb. Ex. Pharmacol.* 25: 389-399, 1970.
- HUDSON, A. R.; KILBURN, K. H.; HALPRIN, G. M.; MCKENZIE, W. N. **Granulocyte recruitment to airways exposed to endotoxin aerosols**. *Am. Rev. Resp. Dis.* 115: 89-95, 1997.
- HUTCHISON, A. A.; HINSON, J. M. JR.; BRIGHAM, K. L.; SNAPPER, J. R. **Effect of endotoxin on airway responsiveness to aerosol histamine in sheep**. *J. Appl. Physiol.* 54: 1463-8, 1983.
- INAMURA, T.; BLACK, K. L. **Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors**. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 862-70, 1994.

ISHIHARA, K.; KAMATA, M.; HAYASHI, I.; YAMASHINA, S.; MAJIMA, M. **Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor.** *Int. Immunopharmacol.* 2: 499-509, 2002.

JAMISON, J. P.; LOWRY, R. C. **Branchial challenge of normal subjects with the endotoxin of *Enterobacter agglomerans* isolated from cotton dust.** *Br. J. Ind. Med.* 43: 327-31, 1986.

KATORI, M.; IWANAGA, S.; KOMIYA, M., HAN, Y. N.; SUZUKI T.; OHISHI, S. **Structure and a possible physiological function of a fragment (“histidine-rich peptide”) released from a bovine plasma high molecular weight kinenogen by plasma Kallikrein.** In *Kininogenases 3*, ed by G. L. Haberland, J. W. Rohren, G. Blümel and P. Huber, pp. 11-18, Schattauer, New York, Stuttgart , 1975.

KELLERMEYER, R. W.; GRAHAM, R. C. **Kinins – Possible physiologic and pathologic roles in man.** *New Engl. J. Med.* 279: 754-759, 802-807, 859-866, 1968.

LACROIX, S.; FEINSTEIN, D.; RIVEST, S. **The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations.** *Brain Pathol.* 8: 625-40, 1998.

LAGNEUX, C.; ADAM, A.; LAMONTAGNE, D. **A study of the mediators involvement in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart.** *Int. Immunopharmacol.* 3: 1511-8, 2003.

LEE, L. Y.; MORTON, R. F. **Histamine enhances vagal pulmonary C-fiber responses to capsaicin and lung inflation.** *Respir. Physiol.* 93: 83-96, 1993.

LEE, L. Y.; MORTON, R. F. **Pulmonary chemoreflex sensitivity is enhanced by prostaglandin E2 in anesthetized rats.** *J. Appl. Physiol.* 79: 1679-86, 1995.

LEGAT, F. J.; GRIESBACHER, T.; LEMBERCK, F. **Mediation by bradykinin of rat paw oedema induced by collagenase from *Clostridium histolyticum*.** *Br. J. Pharmacol.* 22: 453-460, 1994.

- LEMBECK, F.; GRIESBACHER, T.; ECKHARDT, M. **Demonstration on extrapulmonary activity of angiotensin converting enzyme in intact tissue preparations.** *Br. J. Pharmacol.* 100: 49-54, 1990.
- LEVESQUE, L.; DRAPEAU, G.; GROSE, J. H.; RIOUX, F.; MARCEAU, F. **Vascular mode of action of kinin B1 receptors and development of a cellular model for the investigation of these receptors.** *Br. J. Pharmacol.* 109: 1254-62, 1993.
- LEVESQUE, L.; HARVEY, N.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. **Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins.** *Immunopharmacology.* 29: 141-7, 1995.
- LEVY, D.; ZOCHODNE, D. W. **Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain.** *Pain.* 86: 265-71, 2000.
- LEWIS, G. P. – **Kinins in inflammation and tissue injury.** *Handb. Exp. Pharmacol.*, 25: 516-530, 1970.
- LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B. A. **Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors.** *Pharmacol. Rev.* 71: 25-49, 1995.
- MA, Q. P.; EH, L. **Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation.** *Prog. Neurobiol.* 68: 311-23. 2002.
- MA, Q. P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D. **Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat.** *Neuroreport.* 11: 4003-4005, 2000.
- MA, Q. P.; HEAVENS, R. **Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats.** *Neuroreport.* 12: 2311-4, 2001.

- MAGGI, C. A.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P. **CGRP inhibition of electromechanical coupling in the guinea-pig isolated renal pelvis.** *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352: 529-39, 1995.
- MAJNO, G. **Ultrastructure of vascular membrane.** *Handbook of Physiology*, Section 2: circulation, edited by Hamilton, W. F. and Dow, P. Washington, D.C.: Physiological Society, vol. III, 1965.
- MAJNO, G.; SHEA, S. M.; LEVENTHA, L. M. **Endothelial contraction induced by histamine – type mediators: an electron microscopic study.** *J. Cell. Biol.* 42: 647-672, 1969.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J. P. **Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation.** *Gen. Pharmac.* 14: 209-229, 1983.
- MARCEAU, F. **Kinin B₁ receptors: a review.** *Immunopharmacol.* 30: 1-26, 1995.
- MARCEAU, F. **Kinin B₁ receptor induction and inflammation.** In: Farmer S G, editor. *The Kinin system.* San Diego: Academic Press. Pp. 143-156, 1997.
- MARCEAU, F.; BACHVAROV, D. R. **Kinin receptors.** *Clinical Reviews in Allergic Immunol.* 16: 385-401, 1998.
- MARCEAU, F. HESS, J. F., BACHVAROV, D. R. **The B₁ receptors for kinins.** *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386. 1998.
- MARCEAU, F.; ADAM, A.; HOULE, S.; BOUTHILLIER, J.; BACHVAROVA, M.; BACHVAROV, D. R. **Ligand – mediated regulation of kinin receptors in the rabbit.** *Biol. Chem.* 382: 131-133, 2001.
- MARKOWITZ, S.; SAITO, K.; MOSKOWITZ, M. A. **Neurogenically mediated leakage of plasma proteins occurs from blood vessels in dura mater but not brain.** *J. Neurosci.* 7, 4129-4136, 1987.

- MATHIS, S. A.; CRISCIMAGNA, N. L.; LEEB – LUNDBERG, L. M. F. **B₁ and B₂ kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells.** *Mol. Pharmacol.* 50: 128-139, 1996.
- MATIS, W. L.; LAVKER, R. M.; MURPHY, G. F. **Substance P induces the expression of an endothelial leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium.** *J. Invest. Derm.* 94: 492-495, 1990.
- MATSUKADO, K.; SUGITA, M.; BLACK, K. L. **Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B₂ receptors in malignant gliomas.** *Brain Res.* 792: 10-15, 1998.
- MAYHAN, W. G. **Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine – 5 – diphosphate and bradykinin.** *Inflammation.* 16: 295-304, 1992.
- McGEHEE, D. S.; GOY, M. F.; OXFORD, G. S. **Involvement of nitric oxide-cyclic GMP pathway in desensitization of bradykinin responses of cultured sensory neurons.** *Neuron.* 9: 315-324, 1992.
- McLEAN, P. G.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. **Inducible expression of the kinin B₁ receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation.** *Br. J. Pharmacol.* 128: 275-82, 1999.
- McLEAN, P. G.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. **Kinin B₁ receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function.** *Cardiovasc. Res.* 48: 194-210, 2000.
- MEINI, S.; QUARTAR, L.; RIZZI, A.; PATCCHIMI, R.; CUCCHI, P.; GIOLITTI, A.; CALO, G.; REGOLI, D.; CRISCUOLI, M.; MAGGI, C. A. **MEN11270 a novel selective constrained peptide antagonist with high affinity at the human B₂ kinin receptor.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289: 1250-1256, 1999.
- MELMON, K. L.; WEBSTER, M. E.; GOLDFINGER, S. E.; SEEGMILLER, J. E. **The presence of a kinin in inflammatory sinovial effusion from arthritis of varying etiologies.** *Arthritis Rheum.* 10: 13-20, 1967.

- MIZUNO, M.; SADA, T.; IKEDA, M.; FUKUDA, N.; MIYAMOTO, M.; YANAGISAWA, H.; KOIKE, H. **Pharmacology of CS-866, a novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist.** *Eur. J. Pharmacol.* 285: 181-188, 1995.
- MILLS, I. H. – **Kallikrein, Kininogen and Kinins in control of blood pressure.** *Nephron*, 23: 61-71, 1979.
- MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. **Molecular architecture of tight junctions.** *Annu. Rev. Physiol.* 60: 121-42. 1998.
- MOUSSAOUI, S. M., PHILIPPE, L., LE PRADO, N., GARRET, C. **Inhibition of neurogenic inflammation in the meninges by a non-peptide NK1 receptor antagonist, RP 67580.** *Eur. J. Pharmacol.* 238: 421-4, 1993.
- MUNOZ, C. M.; LEEB – LUNDBERG, L. M. F. **Receptor – mediated internalization of bradykinin DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways.** *J. Biol. Chem.* 267: 303-309, 1992.
- MUNOZ, C. M.; COTECCHIA, S.; LEEB – LUNDBERG, L. M. F. **B₂ kinin receptor – mediated internalization of bradykinin en DDT1 MF-2 smooth muscle cells in paralleled by sequestration of the occupied receptors.** *Arch. Biochem. Biophys.* 301: 336-344, 1993.
- MURATA, T.; MATSUMOTO, Y.; KASHIDA, T.; KAMINUMA, O.; NAITO, K.; IKEZAWA, K.; TSUZURAHARA, K. **Difference among angiotensin-converting enzyme inhibitors in potentiating effects on bradykinin-induced microvascular leakage in guinea pig airways.** *Jpn. J. Pharmacol.* 69: 111-118, 1995.
- NADEL, J. A. **Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation in airways.** *Eur. Resp. J.* 4: 745-754, 1991.
- NAKAGAWA, N.; SANO, H.; IWAMOTO, L. **Substance P induces the expression of intracellular adhesion molecule 1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration.** *Peptides.* 16: 721-725, 1995.

- 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.
- NAKANO, S.; MATSUKADO, K.; BLACK, K. I. **Increased brain tumor microvessel permeability after intracarotid bradykinin infusion is mediated by nitric oxide.** *Cancer Res.* 56: 4027-4031, 1996.
- NAKHOSTINE, N.; RIBUOT, C.; LAMONTAGNE, D.; COUTURE, R. **Mediation by B₁ and B₂ receptors of vasodepressor responses to intravenously administered Kinins in anaesthetized dogs.** *Br. J. Pharmacol.* 110: 71-76, 1993.
- NICOLAU, M., SIROIS, M. G., BUI, M., PLANTE, G. E., SIROIS, P., REGOLI, D. **Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats: receptor characterization with agonists and antagonists.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 217-221, 1993.
- NICOLAU, M.; FELTRIN, M.; REGOLI, D. **Induction of bradykinin B₁ hypotensive receptors in rats by lipopolysaccharide.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 337-340, 1996.
- NICOLAU, M.; DOVICH, S. S.; CUTTLE, G. **Pro-inflammatory effect of quercetin by dual blockade of angiotensin converting – enzyme and neutral endopeptidase *in vivo*.** *Nutritional Neurosci.* 6: 309-316, 2003.
- NIES, A. S.; FORSYTH, R. P.; WILLIAMS, H. E.; MELMON, K. L. **Contribution of kinin to endotoxin shock in unanesthetized Rhesus monkey.** *Circ. Res.* 22: 155-164, 1968.
- NOMURA, T.; INAMURA, T.; BLACK, K. L. **Intracarotid infusion of bradykinin selectively increases blood-tumor permeability in 9L and C6 brain tumors.** *Brain Res.* 3; 659: 62-6, 1994.
- NWATOR, I. A. A.; WHALLEY, E. T. **Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of desArg⁹-BK (Kinin B₁) receptors *in vivo*.** *Eur. J. Pharmacol.* 160: 125-132, 1989.

OATES, J. A.; MELMON, K. L. **Biochemical and physiological studies of the kinin in carcinoid syndrome.** *In: Hypotensive peptides.* New York, Springer – Verlag, 563, 1966.

PARDRIDGE, W. M. **William M. Pardridge, Recipient of the AAPS Meritorious Manuscript Award.** *Pharmacol. Res.* 14: 1651-4, 1997

PAUWELS, R. A.; KIPS, J. C.; PELEMAN, R. A.; VAN DER STRAETEN, M. E. **The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats.** *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 540-5, 1990.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. **Modulation of IL-1 induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1.** *J. Immunol.* 150: 992-999, 1993.

PERRON, M-S.; GOBEIL, F.; PELLETTIER, S.; REGOLI, D.; SIROIS, P. **Involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptors in pulmonary leukocyte accumulation induced by Sephadex beads in guinea pigs.** *Eur. J. Pharmacol.* 376: 83-89, 1999.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, B. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA, J. A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S. M.; PESQUERO, J. L.; PAIVA, A. C. M.; CALIXTO, J. B.; LEWIN, G. R.; BADER, M. **Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8140-8145, 2000.

PETERSSON, G.; BACCI, E.; MacDONALD, D. M.; NADEL, J. M. **Neurogenic plasma extravasation in the rat nasal mucosa is potentiated by peptidase inhibitors.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 509-514, 1993.

PHAGOO, S. B.; POOLE, S.; LEEB-LUNDERBERG, L. M. F. **Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts.** *Mol. Pharmacol.* 56: 325-333, 1999.

POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. **Bradykinin B₁ and B₂ receptors, tumor necrose factor α and inflammatory hyperalgesia.** *Br. J. Pharmacol.* 126: 649-656, 1999.

PRADDAUDE, F.; TACK, I.; EMOND, C.; BASCANDS, J. L.; GIROLAMI, J. P.; TRAN-VAN, T.; REGOLI, D.; ADER, J. L. **In vivo and in vitro homologous desensitization of rat glomerular bradykinin B₂ receptor.** *Eur. J. Pharmacol.* 254: 173-182, 1995.

PRUNEAU, D.; BELICHARD, P. **Induction of bradykinin B₁ receptor-mediated relaxation in the isolated rabbit carotid artery.** *Eur. J. Pharmacol.* 239: 63-7, 1993.

PRUNEAU, D.; LUCCARINI, J. M.; DEFRENE, E.; PAQUET, J. L.; BELICHARD, P. **Characterisation of bradykinin receptors from juvenile pig coronary artery.** *Eur. J. Pharmacol.* 297: 53-60, 1996.

RAIDOO, D. M.; BHOOLA, K. D. **Kinin receptors on human neurones.** *J Neuroimmunol.* 77(1): 39-44. 1997.

RAIDOO, D. M.; BHOOLA, K. D. **Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue.** *Pharmacol. Ther.* 79: 105-127, 1998.

RAMON Y CAJAL, S. **The neural and the glial cells.** Transl. By J. De La Torre and W. C. Gisbdon. Springfield, I. L.; Charles C. Thomas, 1984. RAPOPORT, S. I.; OHNO, K.; PETTIGREW, K. D. Drug entry into the brain. *Brain Res.* 172: 354-359, 1979.

RAYMOND, J. J.; ROBERTSON, D. M.; DINSDALE, H. B. **Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier.** *Can. J. Neurol. Sci.* 13: 214-20, 1986.

REESE, T. S.; KARNOVSKY, M. J. **Fine structural localization of a blood – nerve barrier in the mouse.** *J. Cell. Biol.* 34: 107-217, 1967.

REGOLI, D.; BARABE, J.; PARK, W. K. **Receptors for bradykinin in rabbit aortae.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 855-67, 1977.

REGOLI, D.; MARCEAU, F.; BARABE, J. **De novo formation of vascular receptors for bradykinin.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 674-7, 1978.

- REGOLI, D.; BARABÉ, J. **Pharmacology of bradykinin and related kinins.** *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46, 1980.
- REGOLI, D. F.; MARCEAU, F.; LAVIGNE, J. **Induction of B₁ receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide.** *Eur. J. Pharmacol.* 71: 105-1981.
- RENKIN, E. M. **Some consequences of capillary permeability to macromolecules: Starling hypothesis reconsidered.** *Am. J. Physiol.* 250: H706-H710, 1986.
- REVEST, P. A.; ABBOT, N. J.; GILLESPIE, J. I. **Receptor – mediated changes in intracellular [Ca⁺²] in cultured rat brain capillary endothelial cells.** *Brain Res.* 549: 159-161, 1991.
- RHALEB, N. E.; ROUSSI, N.; JUKIC, D.; REGOLI, D.; HENKE, S.; BREIPOHL, G.; KNOLLE, J. **Pharmacological characterization of a new highly potent B₂ receptor antagonist (HOE 140: D-Arg [Hyp³-Thi⁵-D-Tic⁷-Oic⁸] bradykinin.** *Eur. J. Pharmacol.* 210: 115-120, 1992.
- RIBEIRO, S. A.; CORRADO, A. P.; GRAEFF, F. G. – **Antinociceptive action of intraventricular bradykinin.** *Neuropharmacology.* 10: 725-731, 1971.
- ROBERTS, M. L.; MASHFORD, M. L. **Possible physiological and pathological roles of the kallikrein – kinin system.** *Med. J. Aust.* 2: 887-891, 1972.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. **Bradykinin, hipotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venom and by trypsin.** *Am. J. Physiol.* 156: 261-273, 1949.
- ROGERS, D. F.; DIJK, S.; BARNES, P. J. **Bradykinin – induced plasma exudation in guinea-pig airways: involvement of platelet activation factor.** *Br. J. Pharmacol.* 101: 739-745, 1990.
- ROQUES, B. P.; NOBLE, F.; DAUGE, V.; FOURNIE-ZALUSKI, M. C.; BEAUMONT, A. **Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology.** *Pharmacol. Rev.* 45: 87-146, 1993.

- ROSCHER, A. A.; MANGANIELLO, V. C.; JESELMA, C. L.; MOSS, J. **Autoregulation of bradykinin receptors and bradykinin-induced prostacyclin formation in human fibroblasts.** *J. Clin. Invest.* 74: 552-558, 1984.
- ROSCHER, A. A.; KLIER, C.; DENGLER, R.; FAUBNER, A.; MÜLLER-ESTERL, W. **Regulation of bradykinin action at the receptor level.** *J. Cardiovasc. Physiol.* 15: 39-43, 1990.
- ROZSA, Z.; RUSSELL, J.; SALTER, J.; GRANGER, D. N. **Bradykinin mediates p-selectin expression in rat gastrointestinal microvasculature.** *Gastroenterol.* 114: A411, 1998.
- RUBIN, E. R.; FARBER, J. L. **Patologia.** Interlivros Edições LTDA. Rio de Janeiro, RJ. 1990.
- RUEFF, A.; PATEL, I. A.; URBAN, L.; DRAY, A. **Regulation of bradykinin sensitivity peripheral sensory fibres of the neonatal rat by nitric oxide and cyclic GMP.** *Neuropharmacology.* 33: 1139-1145, 1994.
- SARDI, S. P.; PEREZ, H.; ANTUNEZ, P.; ROTHLIN, R. P. **Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein.** *Eur. J. Pharmacol.* 321: 33-8, 1997.
- SARDI, S. P.; ERRASTI, A. E.; REY-ARES, V.; REGINES-VELO, M. P.; ROTHLIN, R. P. **Bradykinin B1 receptor in isolated human umbilical vein: an experimental model of the *in vitro* up-regulation.** *Acta. Pharmacol. Sinica.* 21: 105-110, 2000.
- SARKER, M. H.; FRASER, P. A. **Evidence that bradykinin increases permeability of single cerebral microvessels via free-radicals in the rat.** *J. Physiol.* 479: 36p, 1994.
- SCHANSTRA, J. P.; ALRIC, C.; MARIN-CASTANO, M. E.; GIROLAMI, J. P.; BASCANDS, J. L. **Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role.** *Int. J. Molec. Med.* 3: 185-191, 1999.

- 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.
- SEABROOK, G. R.; BOWERY, B. J.; HEAVENS, R.; BROWN, N.; FORD, H.; SIRINATHSINGHI, D. J. S.; BORKOWSKI, J. A.; HESS, J. F.; STRADER, C. D. HILL, R.G. **Expression of B₁ and B₂ bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal root ganglia neurons from Wild-type and B₂ receptor knockout mice.** *Neuropharmacology.* 36: 1009-1017, 1997.
- SERCOMBE, R.; DINH, Y. R. T.; GOMIS, P. **Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage.** *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 227-249, 2002.
- SHIGEMATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D. C.; KORTHUIS, R. J. **Concentration – dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment, venular hemodynamics, and nitric oxide production in rat mesentery.** *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 277: H152-H160, 1999.
- SHIGEMATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D. C.; KORTHUIS, R. J. **Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms.** *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283: H2676-H2686, 2002.
- SICUTERI, F. **Bradykinins and intracranial circulation in man.** *Hand exp. Pharmacol.* 25: 482-515, 1970.
- SIEBECK, M.; SCHORR, M.; SPANNAGL, E.; LEHNER, M.; FRITZ, H.; CHERONIS, J. C.; WHALLEY, E. T. **B₁ kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection.** *Immunopharmacology.* 40: 49-55, 1998.
- SKIDGEL, R. A.; SCHULZ, W. W.; TAM, L. T.; ERDOS, E. G. **Human renal angiotensin I converting enzyme and neutral endopeptidase.** *Kidney Int Suppl.* 20: S45-8, 1987.
- SMITH, R. J.; JUSTEN, J. M.; NIDY, E. G.; SAM, L. M.; BLEASDALE, J. E. **Transmembrane signaling in human polymorphonuclear neutrophils: 15(S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid modulates receptor agonist-triggered cell activation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 7270-4. 1993.

- STERANKA, L. R.; BURCH, R. M. **Bradykinin antagonists in pain and inflammation.** In *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinic Research.* P. 191-211. Edited by Burch, R. M. Marcel Dekker Inc. New York, Basle, Hong Kong, 1991.
- STERANKA, L. R.; MANNING, D. C.; DEHASS, C. J.; FERKANY, J. W.; BOROSKY, S. A.; CONNOR, J. R.; VAVREK, R. J.; STEWART, J. M.; SNYDER, S. H. **Bradykinin as a pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 3245-3249, 1988.
- STREETEN, D. H. P.; KERR, L. P.; KERR, C. B.; PRIOR, J. C.; DALAKOS, T. G. **Hyperbradykininism: A new orthostatic syndrome.** *Lancet.* 2: 1048-1053, 1972.
- SUNG, C. P.; ARLETH, A. J.; AIYAR, N.; BHATNAGAR, P. K.; LYSKO, P. G.; FEUERSTEIN, G. **CGRP stimulates the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells.** *Peptides* 13: 429-434, 1992.
- SVENJO, E.; GREGA, G. J. **Evidence for endothelial cell – mediated regulation of macromolecular permeability by postcapillary venules.** *Fed. Proc.* 45: 89-95, 1986.
- TAUB, J. S.; GUO, R.; LEUB-LUNDBERG, L. M.; MADDEN, J. F.; DAAKA, Y. **Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer.** *Cancer Res.* 63: 2037-41, 2003.
- THURSTON, G.; BALDWIN, A. L.; WILSON, L. M. **Changes in endothelial action cytoeskeleton at leakage sites in the rat mesenteric microvasculature.** *Am. J. Physiol.* 37: H316-320, 1996.
- TOMODA, F.; LEW, R. A.; SMITH, A. I.; MADDEN, A. C.; EVANS, R. G. **Role of bradykin receptors in the renal effects of inhibition of angiotensin converting enzyme and endopeptidases 24.11 and 24.15 in conscious rabbits.** *Br. J. Pharmacol.* 119: 365-373, 1996.
- TORSTILLA, I. **The plasma kinin system in acut C.e myocardial infarction.** *Acta Med Scand*, 620 (suppl.) 1-62, 1978.

- TOUMANEN, E.; PRASAD, S. M.; GEORGE, J. S. **Reversible opening of the blood brain barrier by anti-bacterial antibodies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7824-7828, 1993.
- TRAUTSCHOLD, I. **Assay methods in the kinin system.** *Handb. Exp. Pharmacol.* 25: 52-81, 1970.
- UNTERBERG, A.; WAHL M.; BAETHMANN A. **Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 574-85, 1984.
- VIANNA, R. M. J. **O papel dos receptores B₁ das cininas na diabete causada por estreptozotocina: uma abordagem funcional e autoradiográfica.** Tese de Doutorado apresentada à PG de Farmacologia, UFSC, Florianópolis. 2003.
- VIANNA, R. M. J.; CALIXTO, J. B. **Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by desArg⁹BK in mouse pleurisy.** *Br. J. Pharmacol.* 123: 281-291, 1998.
- VRIES, H. E.; KUIPER, J.; BOER, A. G.; VAN BERKEL, T. J. C.; BREIMER, D. **The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases.** *Pharmacol. Rev.* 49: 145-155, 1997.
- WAHL, M., UNTERBERG, A., BAETHMANN, A.; SCHILLING, L. **Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic edema.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 621-634, 1988.
- WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. **Kinin and kinin receptors in the nervous system.** *Neurochem. Int.* 26: 1-16, 1995.
- WALL, M.; UNTERBERG, A.; WHALLEY, E. T.; BACTHMANN, A.; YOUNG, R.; EDVINSSON, L.; WAGNE, F. F. W. **Effects of bradykinin on cerebral haemodynamic and blood-brain barrier function.** *In: Edvinsson L. et. Al., eds.; Peptidergic Mechanisms in the Cerebral Circulation* Norwood, Chichester. 166-190, 1987.

- WARWICK, R. E.; EIKE, J. R.; CHAN, P. H.; ANDERSON, D. K.; ROSS, G. Y.; GUTIN, P. H. **Measurement of vascular permeability in spinal cord using Evans blue – spectrophotometry and correction for turbidity.** *J. Neurosci. Methods.* 58: 167-171, 1995.
- WATANABE, M.; YOSHIHAR, S.; ABE, T.; OYAMA, M.; ARISAKA, O. **Effects of the orally active non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist, FR 173657, on plasma extravasations in guinea pig airways.** *Eur. J. Pharmacol.* 367: 373-378, 1999.
- WERLE, E.; GÖTZE, W.; KEPLER, A. **Über die wirkung des kallikrein auf den isolierten darm und über eine neue darmkontrahierende substanz.** *Biochem. Z.* 289: 217-223, 1937.
- WHALLEY, E. T.; SOLOMON, J. A.; MADAFFERI, D. M.; BONHAM, K.A.; CHERONIS, J. C. **CP-0127, a novel potent bradykinin antagonist, increases survival in rat a rabbit models of endotoxis shock.** *Agents and Actions.* 38151 : 413-420, 1984.
- WIEMER, G.; POPP, R.; SCHOLKENS, B. A.; GOGELIN, H. **Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells.** *Brain Res.* 638: 649-656, 1999.
- WILLE, P. R.; VITOR, R.; GABILAN, N. H.; NICOLAU, M. **Effect of quercetin on tachykinin – induced plasma extravasation in rat urinary bladder.** *Phytotherapy Res.* 15: 444-446, 2001.
- WILHELM, D. L. **Chemical mediators in: The Inflammatory Process.** *B. W. Zweifch. L. Grant (Academic Press New York) 2^o ed. 2: 251, 1973.*
- WIRTH, K.; HOCK, F. J.; ALBUS, U.; LINZ, W.; APLERMANN, H. G.; ANAGNOSTOPOULOS, H.; HENK, S.; BREIPOHL, G.; KONIG, W.; KNOLLE, J. **HOE 140 a new potent and long acting bradykinin – antagonist: *in vivo* studies.** *Br. J. Pharmacol.* 120: 774-777, 1991.

WOLSING, D. H.; ROSENBAUM, J. S. **The mechanism for the rapid desensitization in bradykinin-stimulated inositol monophosphate production in NG 108-15 cells involves interaction of a single receptor with multiple signaling pathways.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 253-261, 1993.

WOTHERSPOON, G.; WINTER, J. **Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system.** *Neurosci Lett.* 294: 175-178, 2000.

ZHAO, L.; ZHANG, M. M.; NG, K. **Effects of vascular permeability factor on the permeability of cultured endothelial cells from brain capillaries.** *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32: 1-4, 1998.