



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

DANIELA BALZ HARA

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS
CONTRÁTEIS INDUZIDAS POR AGONISTAS B₁ E B₂ PARA AS
CININAS EM CÓLONS DE CAMUNDONGOS: INFLUÊNCIA DA
COLITE INDUZIDA POR TNBS**

*Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.*

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

Florianópolis
2007

HARA, Daniela Balz. **Estudo dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas por agonistas B₁ e B₂ para as cininas em cólons de camundongos: Influência da colite induzida por TNBS.** Florianópolis, 2007, 171p. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 26/07/2007

O presente estudo analisou através de técnicas farmacológicas alguns mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons normais ou com colite por TNBS. Foi constatado que a contração induzida pela BK e análogos é mediada por receptores do tipo B₂ e não por receptores do tipo B₁. Além disso, foi demonstrado que a resposta contrátil à BK é mediada pelo influxo de cálcio externo, ativação de canais de cálcio do tipo L e N, liberação neuronal de acetilcolina, pela participação de neuropeptídeos, prostanóides, leucotrienos e pelo TRPV1. Também foi demonstrado que o receptor B₁ pode ser induzido *in vitro* após a montagem das preparações alcançando respostas contráteis máximas em 6-8 h. Também foi evidenciado que a colite promove aumento da resposta contrátil à BK e a des-Arg⁹-BK sugerindo a indução dos receptores B₁ e B₂. Essa hipótese foi confirmada através da realização do ensaio de união específica com os ligantes [³H]-BK ou [³H]-des-Arg¹⁰-calidina, os quais revelaram aumento na densidade de ambos os receptores sem, no entanto, causar alteração da afinidade desses receptores pelo agonista. Ademais, foi constatado que na colite ocorreu aumento da expressão do RNAm para os receptores das cininas. Confirmou-se também, pela utilização de animais com deleção gênica para os receptores B₁ ou B₂, que ambos são necessários para a indução do dano tecidual colônico. Por outro lado, foi verificada que a indução *in vivo* do receptor B₁ é dependente de síntese protéica, PI3K γ , NF- κ B, TNF α e da participação da iNOS. Os estudos também indicam que a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK envolve o influxo de cálcio externo, a ativação de canais de cálcio do tipo L, da degradação do ácido araquidônico bem como de seus metabólitos, de enzimas iNOS e eNOS e proteínas quinases PKA, PKC, PI3K γ e MEK. Os resultados do presente trabalho contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis mediadas pelos receptores B₁ e B₂, bem como o papel desses receptores na colite ulcerativa.

Palavras Chaves: Bradicina, des-Arg⁹-BK, colite ulcerativa, resposta contrátil, densidade de receptores, RNAm, peptídeos pró-inflamatórios.

*“Por mais que a situação seja
desesperadora, sempre brilha a luz da
esperança”.*

Daisaku Ikeda

*Dedico este trabalho a minha mãe
Beatriz Albana Rettore,
minha irmã Andréia Balz
e ao meu marido
Américo Hiroyuki Hara.*

Agradecimentos:

À mina mãe Beatriz Albana Rettore, minha irmã Andréia Balz e ao meu amigo Ronaldo José da Silva, pelo amor, carinho e apoio recebido.

Ao meu marido Americo Hiroyuki Hara pelo amor, apoio, paciência, compreensão e por toda nossa grande família.

Aos Professores Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues e Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por terem me acolhido quando cheguei a Florianópolis para estudar. Agradeço imensamente o apoio e o incentivo.

Ao professor Dr. João Batista Calixto pela oportunidade de ter sido sua orientanda e por compartilhar seu conhecimento. Obrigado por tornar esses anos, inesquecíveis e tão importantes tanto no profissional como no pessoal.

À professora Dra. Maria Martha Campos pelo apoio na realização desta tese, conhecimento, compreensão e amizade.

Ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez por sua amizade, por seu entusiasmo de educador.

Ao professor Dr. Jamil Assreuy por ter sido coordenador da Pós-Graduação, por seu apoio, compreensão, conhecimento e dedicação.

Ao professor Dr. Giles Alexander Rae por sua amizade, conhecimento como professor e pesquisador, dicas, apoio, exemplo de cavalheirismo. O Sr é um gentleman.

À professora Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau por seu exemplo como pesquisadora e educadora, por seu apoio e incentivo.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, por todo o conhecimento compartilhado.

À Patrícia, pelo apoio, por sempre estar pronta para ajudar, sem você a entrega do projeto de doutorado não teria acontecido. Lembra!

À Adenir por ter me ensinado a trabalhar com a técnica de órgão isolado, pela amizade, carinho, por nossas conversas inesquecíveis.

À Aline e Juliana, sem vocês esse trabalho certamente não teria sido realizado. Obrigada por todo o apoio técnico, amizade e compreensão.

Ao Pedro por ser tão dedicado e prestativo. Obrigada pelo apoio.

Ao Rafael por seu apoio, amizade e carinho. Saudade!

Ao Sr. Toninho considerado um super-herói, obrigada por sempre estar pronto para ajudar, consertar e remendar qualquer peça do equipamento de órgão isolado. Muito obrigada por seu apoio.

Aos meus colegas de laboratório, todos sem exceção, que me apoiaram, incentivaram e colaboraram para que esse trabalho fosse possível. Obrigada pela colaboração e amizade.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite, Giselle Fazzioni Passos, Dra. Elizabeth Soares Fernandes, Dr. Rodrigo Medeiros, Dr. Valfredo Schelemper, Dr. Octávio de Menezes Lima Júnior, Dra. Mariem El Sayah e Dra. Daniela de Almeida Cabrini por terem me ajudado com dicas, correções na tese, apoio e carinho.

A Diana por seu apoio, dedicação à pós-graduação em farmacologia e amizade.

A todos os funcionários do departamento de farmacologia incluindo o serviço terceirizado de vigilância.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Doenças inflamatórias intestinais.....	01
1.2. O sistema caliceína-cininas e o trato gastrointestinal.....	11
1.2.1. Histórico das cininas.....	11
1.2.2. Síntese e degradação das cininas.....	13
1.2.3. Os receptores para as cininas.....	14
1.2.4. Receptores para as cininas e suas vias de transdução.....	17
1.2.5. Indução dos receptores B ₁	18
1.2.6. As cininas e a IBD.....	19
1.3. Modelos animais para o estudo da IBD.....	21
1.4. Os tratamentos da IBD.....	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. ANIMAIS.....	27
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS CININAS <i>IN VITRO</i> EM CÓLONS DE CAMUNDONGOS.....	28
3.2.1. Montagem dos cólons para estudo <i>in vitro</i>	28
3.2.2. Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas em cólons de camundongos...	29
3.2.3. Caracterização funcional dos possíveis mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos.....	30
3.2.3.1. Participação do cálcio extracelular e de canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK no cólon de camundongos.....	30

3.2.3.2. Envolvimento do sistema colinérgico e de canais de sódio nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	31
3.2.3.3. Participação dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	32
3.2.3.4. Influências dos neuropeptídeos e o CGRP nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	32
3.2.3.5. Estudo da contribuição dos receptores vanilóides nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	33
3.2.4. Estudo da indução <i>in vitro</i> do receptor B ₁ para as cininas em preparações de cólons de camundongos.....	33
3.2.4.1. Avaliação temporal das respostas contráteis induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos.....	33
3.2.4.2. Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B ₁ e B ₂ nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos.....	34
3.3. PADRONIZAÇÃO DA COLITE EXPERIMENTAL.....	34
3.3.1. Indução da colite experimental em camundongos.....	34
3.3.2. Avaliação do dano macroscópico após a indução da colite experimental por TNBS.....	35
3.3.2.1. Análise temporal do dano macroscópico após a indução de colite com TNBS em camundongos.....	36
3.3.2.2. Características externas dos cólons com colite para posterior montagem no órgão isolado e viabilidade.....	37
3.3.3. Estudo do dano microscópico após a indução da colite experimental por TNBS.....	39
3.3.3.1. Caracterização do dano microscópico ocasionado após a indução da colite por TNBS em camundongos.....	40
3.3.4. Influência da colite induzida por TNBS sobre a migração celular: atividade da MPO.....	40
3.4. ESTUDO FUNCIONAL, BIOQUÍMICO E MOLECULAR DAS CININAS E SEUS RECEPTORES NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO CÓLON.....	41

3.4.1. Análise temporal das respostas contráteis induzida pela BK e pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	41
3.4.2. Estudo da densidade e afinidade dos receptores B ₁ e B ₂ em cólons de camundongos com ou sem colite experimental: ensaio de união específica	42
3.4.2.1. Preparação das membranas de cólon.....	42
3.4.2.2. Ensaio de união específica (<i>binding</i> de saturação).....	43
3.4.3. Quantificação do RNA mensageiro para os receptores B ₁ e B ₂ das cininas em cólons de camundongos com colite experimental.....	44
3.4.3.1. Extração do RNA total.....	45
3.4.3.2. Confecção do c-DNA (Reação de Transcrição Reversa).....	46
3.4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR dos c-DNAs obtidos).....	46
3.4.4. Estudo da colite experimental em animais com deleção gênica para os receptores B ₁ e B ₂	47
3.5. POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DO RECEPTOR B ₁ NA COLITE POR TNBS.....	48
3.5.1. Papel da síntese protéica na indução do receptor B ₁ e nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	49
3.5.2. Possível participação da via fosfatidil inositol-3-kinase γ (PI3K γ) na indução do receptor B ₁ em cólons de camundongos com colite.....	50
3.5.3. Participação do NF- κ B na indução do receptor B ₁ em cólons de camundongos submetidos à colite experimental.....	50
3.5.4. Investigação da participação da citocina TNF α sobre a indução do receptor B ₁ em cólon de camundongos na colite experimental por TNBS.....	51
3.5.5. Estudo da participação da iNOS na indução do receptor B ₁ em cólons de camundongos na colite experimental induzida por TNBS.....	52
3.6. POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA CONTRÁTIL DESENCADEADA PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR B ₁ EM CÓLONS DE CAMUNDONGOS COM COLITE.....	53
3.6.1. Participação dos receptores B ₁ e B ₂ na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	53

3.6.2. Influência do cálcio extracelular e de canais de cálcio do tipo L nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	53
3.6.3. Possível envolvimento da liberação de ácido araquidônico, das enzimas COX, LOX e seus subprodutos eicosanóides nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	55
3.6.4. Participação da via do óxido nítrico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	56
3.6.5. Influência das proteínas quinases nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite.....	56
3.7. DROGAS E REAGENTES	57
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4. RESULTADOS	60
4.1. Caracterização da resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons de camundongos.....	60
4.2. Participação do cálcio extracelular e de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos.....	65
4.3. Estudo do envolvimento do sistema colinérgico e de canais de sódio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos.....	67
4.4. Contribuição dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	69
4.5. Participação dos neuropeptídeos e do CGRP nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos.....	71
4.6. Contribuição dos receptores vanilóides sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos.....	73
4.7. Avaliação da indução <i>in vitro</i> do receptor B ₁ para as cininas em cólons de camundongos.....	74
4.8. Estudo dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos.....	75
4.9. Caracterização da colite experimental induzida por TNBS em cólons de camundongos.....	78
4.10. Avaliação da expressão dos receptores para as cininas em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS.....	81
4.11. Papel dos receptores para as cininas na colite induzida por TNBS.....	86

4.12. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel dos inibidores de síntese protéica.....	87
4.13. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel da fosfatidil inositol-3-quinase γ (PI3K γ).....	89
4.14. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel do fator nuclear- κ B (NF- κ B).....	91
4.15. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel do fator de necrose tumoral- α (TNF α).....	93
4.16. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel da óxido nítrico sintase indutível (iNOS).....	96
4.17. Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	98
4.18. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B ₁ , des-Arg ⁹ -BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel do cálcio extracelular e de canais de cálcio do tipo L.....	99
4.19. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B ₁ , des-Arg ⁹ -BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel da via do ácido araquidônico.....	101
4.20. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B ₁ , des-Arg ⁹ -BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel do óxido nítrico (NO)	104
4.21. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B ₁ , des-Arg ⁹ -BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel das proteínas quinases.....	106
5. DISCUSSÃO.....	108
5.1. Respostas contráteis induzidas pela BK e seus análogos em cólons de camundongos.....	108
5.2. Avaliação das cininas e seus receptores B ₁ e B ₂ em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS.....	118
5.3. Estudo de alguns dos mecanismos envolvidos na indução do receptor B ₁ em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS.....	123

5.4. Análise das respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos obtidos após a indução da colite por TNBS.....	134
6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	143
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
8. ANEXOS.....	170
9. PUBLICAÇÕES.....	171

APCs: Célula apresentadora de antígeno
antigen-presenting cell

AZA: Azatioprina

BK: Bradicinina

B₁R^{-/-}: Animal com deleção gênica para o receptor B₁

B₂R^{-/-}: Animal com deleção gênica para o receptor B₂

CD: *Crohn's disease*

CCh: Carbacol

CGRP: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

COX: Ciclooxigenase

DAG: Diacilglicerol

DAK: des-Arg¹⁰-*Kallidin*

DNAc: DNA complementar

FDA: *Food and Drug Administration*

IBD: *Inflammatory Bowel Disease*

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule*

IL: Interleucina

IP3: Inositol-trifosfato

LPS: Lipopolissacarídeo

LOX: Lipooxigenase

MPO: Mieloperoxidase

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NFκB: Fator Nuclear- κ B
Nuclear Factor-κ B

NIH: National Institute of Health

NO: Óxido nítrico
Nitric Oxide

NOD: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain*

NSAIDs: Antiinflamatórios não esteroidais
non steroidal anti-inflammatory drugs

OCTN: *Organic Cation Transporter*

PAF: Fator de ativação plaquetária

PI3Kγ: Fosfatidilinositol-3-quinase γ

RT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polymerase
reverse transcriptase - polymerase chain reaction

SNC: Sistema Nervoso Central

SNE: Sistema Nervoso Entérico

SNP: Sistema Nervoso Periférico

T_H: T *helper cell*

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNBS: Ácido-2,4,6 trinitrobenzeno-sulfônico

TTX: Tetrodotoxina

UC: *Ulcerative Colitis*

VCAM : *Vascular-cell adhesion molecule*

6-MP: 6-mercaptopurina

Figura 1. Características dos cólons para montagem no órgão isolado.....	38
Figura 2. Protocolo de indução da colite por TNBS em camundongos juntamente com os tratamentos <i>in vivo</i>	48
Figura 3. Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas em cólons isolados de camundongos.....	62
Figura 4. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos.....	64
Figura 5. Papel do cálcio extracelular e de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos.....	66
Figura 6. Papel do sistema colinérgico e de canais de sódio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos.....	68
Figura 7. Papel dos derivados da via do ácido araquidônico sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos.....	70
Figura 8. Papel dos neuropeptídeos e do CGRP na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos.....	72
Figura 9. Papel do receptor vanilóide TRPV1 na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos.....	73
Figura 10. Avaliação da indução <i>in vitro</i> do receptor B ₁ para as cininas em cólons de camundongos.....	75
Figura 11. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos.....	76
Figura 12. Efeito dos antagonistas seletivos para o receptor B ₁ das cininas sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos.....	77
Figura 13. Avaliação do dano macroscópico e da atividade da MPO em cólons de camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS.....	79
Figura 14. Avaliação do dano microscópico em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	80
Figura 15. Análise da resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons de camundongos controle ou com colite induzida por TNBS.....	82
Figura 16. Avaliação da união específica para os receptores das cininas em cólons de camundongos controle ou com colite induzida por TNBS.....	84

Figura 17. Avaliação da expressão do RNAm para os receptores das cininas em cólons de camundongo com colite induzida por TNBS.....	85
Figura 18. Avaliação do dano macroscópico e da atividade da MPO em cólons de camundongos com deleção gênica para os receptores das cininas com colite induzida por TNBS.....	86
Figura 19. Efeito dos inibidores de síntese protéica sobre a indução do receptor B ₁ <i>in vivo</i> em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	88
Figura 20. Efeito do inibidor da fosfatidil inositol-3-quinase γ (PI3K γ) sobre a indução do receptor B ₁ <i>in vivo</i> em camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	90
Figura 21. Efeito do inibidor do fator nuclear κ B (NF- κ B) sobre a indução do receptor B ₁ <i>in vivo</i> em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	92
Figura 22. Papel do fator de necrose tumoral- α (TNF α) sobre a indução do receptor B ₁ <i>in vivo</i> em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	95
Figura 23. Papel da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) sobre a indução do receptor B ₁ <i>in vivo</i> em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	97
Figura 24. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	99
Figura 25. Papel do cálcio extracelular e canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	100
Figura 26. Efeito dos inibidores da fosfolipase na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	102
Figura 27. Efeito dos inibidores das ciclooxigenases e do antagonista do receptor de LTD ₄ na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	103
Figura 28. Efeito dos inibidores das NOS na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	105
Figura 29. Efeito dos inibidores das proteínas quinases na resposta contrátil induzida pela des-Arg ⁹ -BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS.....	107

Figura 30. Vias de transdução de sinal que estão associadas às respostas das cininas..... 141

Figura 31. Exemplo de algumas vias de sinalização celular, que podem influenciar na indução dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na colite por TNBS..... 142

Tabela 1. Modelos animais de inflamação intestinal crônica.....	21
Tabela 2. Escala usada para avaliação do dano macroscópico na colite induzida por TNBS.....	36
Tabela 3. Escala utilizada para avaliação do dano microscópico na colite induzida por TNBS.....	39
Tabela 4. Ordem de potências relativas para diferentes agonistas cininérgicos em preparações de cólons isolados de camundongos	63

Resumo:

O objetivo do presente estudo foi analisar através de técnicas farmacológicas alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons normais ou com colite por TNBS, bem como, avaliar a contribuição das cininas na *inflammatory bowel disease* (IBD). No presente trabalho foi constatado que a contração induzida pela BK e análogos é mediada por receptores do tipo B₂ e não por receptores do tipo B₁ indicando assim que esses receptores não são expressos de maneira constitutiva nessa preparação. Além disso, foi demonstrado que a resposta contrátil à BK é mediada pelo influxo de cálcio externo, ativação de canais de cálcio do tipo L e N, liberação neuronal de acetilcolina, pela participação de neuropeptídeos, prostanóides, leucotrienos e pelo TRPV1. Este estudo demonstrou que o receptor B₁ pode ser induzido *in vitro* após a montagem das preparações alcançando respostas contráteis máximas nos tempos de 6-8 h. Os resultados também mostraram que a colite promove aumento da resposta contrátil à BK e a des-Arg⁹-BK sugerindo a indução dos receptores B₁ e B₂. Essa hipótese foi confirmada através da realização do ensaio de união específica com os ligantes [³H]-BK ou [³H]-des-Arg¹⁰-calidina, os quais revelaram aumento na densidade de ambos os receptores B₁ e B₂ sem, no entanto, causar alteração da afinidade desses receptores pelo agonista. Ademais, foi constatado que na colite ocorreu aumento da expressão do RNAm para os receptores das cininas. Além disso, confirmou-se também, pela utilização de animais com deleção gênica para os receptores B₁ ou B₂, que ambos os receptores são necessários para a indução do dano tecidual colônico. Por outro lado, foi verificada que a indução *in vivo* do receptor B₁ é dependente de síntese protéica, PI3K γ , NF- κ B, TNF α e da participação da iNOS. Finalmente, os estudos também indicam que a resposta contrátil induzida pelo agonista B₁ a des-Arg⁹-BK envolve o influxo de cálcio externo, a ativação de canais de cálcio do tipo L, da degradação do ácido araquidônico bem como de seus metabólitos, de enzimas iNOS e eNOS e proteínas quinases PKA, PKC, PI3K γ e MEK. Os resultados do presente trabalho contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis mediadas pelos receptores B₁ e B₂, bem como o papel desses receptores na colite ulcerativa contribuindo assim para o desenvolvimento de uma nova terapia para a IBD

Abstract:

The present study aimed to analyze, using pharmacological approaches, some of the mechanisms involved in kinin-induced contractile responses of the normal and inflamed mouse colon, as well as evaluate the contribution of the kinin system into inflammatory bowel disease. In the present work we demonstrated that the BK-induced contraction in the mouse colon is mediated by the B₂ receptor, whereas the selective B₁ receptor agonist des-Arg⁹-BK had no effect. The BK-induced contraction revealed the involvement of the external calcium influx, activation of L- and N-type voltage-gated calcium channels, neural release of acetylcholine, the participation of neuropeptides, prostanoids, leukotrienes and TRPV1. This study also demonstrated that the B₁ receptor is not constitutively expressed in the mouse colon, however 6-8 h after set up of the preparations, time-dependent induction of this receptor occurs. Our results revealed that TNBS-induced colitis was associated with a striking increase of both B₁ and B₂ receptor-mediated contractile responses and suggest that colitis is capable of causing an enhancement of kinin receptor population. This data also was assessed by means of saturation binding studies using [³H]-BK or [³H]-des-Arg¹⁰-kallidin which revealed a marked increase in B₁ and B₂ densities, without alterations of affinities. Moreover, it was demonstrated that colitis leads to an increase of B₁ and B₂ receptors mRNA expression and by use of knockout mice was also confirmed that both B₁ and B₂ receptors are essential to colon damage. This study provided evidences on the relevance of protein synthesis, PI3K γ , NF- κ B, TNF α and the participation of iNOS in the *in vivo* induction of B₁ receptors. Besides, it was demonstrated that the des-Arg⁹-BK-induced contraction following colitis can be modulated by external calcium influx, activation of voltage-gated L calcium channels, the derivatives of the araquidonic acid, the iNOS and eNOS as well as the contribution of PKA, PKC, PI3K γ e MEK. Together, these results leads to a better comprehension into the mechanisms involved in kinin B₁ and B₂ mediated contraction and the role of these receptors in the genesis and maintenance of ulcerative colitis, contributing to the future therapeutic options for treating inflammatory bowel diseases.

Key-words: Bradykinin, des-Arg⁹-BK, inflammatory bowel disease, contractile mechanisms, receptor densities, mRNA expression, pro-inflammatory peptides.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças inflamatórias intestinais

A função intestinal varia bastante, não apenas de um indivíduo para outro, mas também no mesmo indivíduo em momentos diferentes. A homeostasia intestinal pode ser afetada pela dieta, estresse, medicação, doenças e por padrões culturais e sociais (Lerebours *et al.*, 2006). As patologias que acometem o trato gastrointestinal têm merecido maior atenção nas últimas décadas, pois, de forma generalizada podem desencadear desconforto, quadros de depressão e até a invalidez do indivíduo (Schottenfeld e Beebe-Dimmer, 2006; Varghese *et al.*, 2006; Baumgart e Carding, 2007).

As doenças conhecidas como doenças inflamatórias do intestino (do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*, IBD), são clinicamente classificadas em doença de Crohn (do inglês *Crohn's disease*, CD) e colite ulcerativa (do inglês *ulcerative colitis*, UC). A primeira descrição médica de uma patologia que envolveria o intestino (denominada mais tarde como CD) foi realizada pelo médico alemão Wilhelm Fabry em 1623. Anos depois, houve a descrição da colite ulcerativa em 1859, com a publicação feita pelo Doutor Samuel Wilks. Posteriormente, em 1932, com a publicação dos Doutores Burrill B. Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg, a inflamação intestinal passou a ser denominada de doença de Crohn (para revisão ver: Lichtenstein, 2006; Baumgart e Carding, 2007). Desde as primeiras descrições, estabeleceu-se que a doença de Crohn pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, enquanto que a colite ulcerativa é restrita ao cólon e o reto (Bouma e Strober, 2003; Lichtenstein *et al.*, 2006). Ambas as doenças possuem sintomas

bastante similares incluindo dor abdominal, sangramento retal, diarreia, desidratação, perda de peso, letargia, dispepsia e em alguns casos ocorrendo ainda problemas de erupções cutâneas, inflamações oculares (uveíte), problemas de ordem psico-social como a depressão e disfunções endócrinas (Hanauer e Present, 2003; Varghese *et al.*, 2006).

Quanto à localização geográfica, a CD e a UC apresentam-se como doenças gastrointestinais de países desenvolvidos. Estudos populacionais sobre a prevalência da IBD sugerem que aproximadamente um em duzentos e cinquenta europeus, está ou poderá ser afetados pela IBD durante a vida (Shivananda *et al.*, 1996; Bouma e Strober, 2003). Contudo, até a última década, uma baixa prevalência da doença foi encontrada em outras partes do mundo, incluindo Europa Oriental, América do Sul, Ásia e a região do Oceano Pacífico. No entanto, novos estudos indicam que a epidemiologia da IBD está em ascensão em áreas consideradas de baixa incidência, enquanto que em outras como o oeste da Europa e a América do norte tem-se observado uma aparente estabilização no número de casos de IBD (Lakatos, 2006; Baumgart e Carding, 2007).

A etiologia da IBD ainda não está completamente esclarecida. Algumas hipóteses postulam que a IBD é uma doença multifatorial. Os fatores que estariam envolvidos compreenderiam: respostas imunes inapropriadas da mucosa intestinal envolvendo antígenos provenientes da flora bacteriana comensal, susceptibilidade genética, alterações relevantes na composição da flora bacteriana (inclusão de patógenos até então não identificados), deficiência no sistema imune inato, defeitos na camada epitelial intestinal, apresentação anormal de antígenos intraluminais por células apresentadoras de antígenos (do inglês *antigen-presenting cells*, APCs), desregulação das respostas das células mononucleares da lâmina própria,

exposição exacerbada a mediadores pró-inflamatórios e exposição ambiental inadequada (Podolsky, 2002; Bouma e Strober, 2003; Bamias e Cominelli, 2007; Baumgart e Carding, 2007).

Muitos dados obtidos de pacientes com doenças intestinais e trabalhos publicados com modelos animais de inflamação intestinal sugerem que a CD e a UC resultam de respostas imunes inadequadas frente a patógenos entéricos em indivíduos susceptíveis (para revisão ver: Farrell e Peppercorn, 2002). Essa predisposição não envolveria somente fatores genéticos, mas também o ambiente ao qual o indivíduo é exposto. Esses fatores ambientais incluiriam o estresse psicológico, a intolerância a alguns fármacos, como as drogas antiinflamatórias não esteroidais (do inglês *non steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs), infecções excessivas e o não recebimento de leite materno na infância (Theis e Boyko, 1994; Wurzelmann *et al.*, 1994; Corrao *et al.*, 1998). Trabalhos como o de Qiu *et al.*, (1999) demonstraram que o estresse provocado em camundongos aumenta a permeabilidade intestinal, o que pode colaborar para a instalação de um quadro infeccioso. Contudo, no que diz respeito aos fatores ambientais e a IBD, o aspecto mais curioso envolve o ato de fumar cigarros, onde devido à nicotina, fumantes parecem desenvolver uma proteção contra o desenvolvimento de UC, mas não para a CD. Tem sido demonstrado que o ato de fumar cigarros, concomitante à exposição à nicotina afeta a imunidade celular (inibindo respostas do tipo T_H2, reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias), aumenta a produção de muco no cólon, reduz a motilidade intestinal, mas não afeta a permeabilidade intestinal (Sher *et al.*, 1999).

Dentre os diversos fatores que estão associados à IBD, os genéticos colaboram grandemente para o entendimento da doença. Primeiramente, estudos

com gêmeos monozigóticos e dizigóticos indicaram que a CD e a UC apresentam maior correlação entre gêmeos monozigóticos do que dizigóticos (Tysk *et al.*, 1988; Orholm *et al.*, 1991). Além disso, Hugot *et al.*, (1996) realizaram o mapeamento de um locus do cromossomo 16 relacionado à susceptibilidade à CD. Dessa forma, foi possível avaliar, através de dados epidemiológicos a alta herdabilidade associada à IBD, com uma ocorrência familiar para parentes de primeiro grau variando entre 2 e 22 %. Nos últimos anos, muito se tem descoberto acerca dos genes que podem estar associados à IBD. Em particular, o primeiro gene específico associado com a CD identificado foi o membro 15 da família dos domínios de ativação e recrutamento de caspases (do inglês *caspase activation and recruitment domain molecule 15*, CARD15; também conhecido como NOD2, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain 2*) (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Progressivamente, seguiram-se identificações de regiões do genoma humano através de mapeamento de ligações usando-se marcadores microsatélites com graus variados de influência sobre a susceptibilidade à IBD; dessa forma foi possível a identificação de 9 loci denominados IBD 1-9. Entretanto, alguns loci parecem ser específicos para a CD como o IBD 1, ou para a UC como IBD 2 e outros como o IBD 3 estão associados com ambas CD e UC, no que diz respeito à inflamação na região do cólon. Interessantemente, a região IBD 5 está sendo sugerida como uma possível região de susceptibilidade à CD em pacientes jovens, devido à presença dentro dela de variantes gênicas; esses genes são chamados de transportadores de cátions orgânicos (do inglês *organic cation transporter*, OCTN; com modificações quanto a posição, sendo atribuída a nomenclatura OCTN1 e OCTN2) (para revisão ver: Gaya, 2006; Baumgart e Carding, 2007).

Outros dois grupos de genes têm demonstrado um potencial de ligação com IBD, são eles, o da resistência a múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance member 1*, MDR1, também conhecido como ABCB1, do inglês *ATP-binding cassette subfamily B member 1*) e o *drosophila disc large homologue 5 gene* (DLG5). Quanto ao gene da MDR1, sabe-se que camundongos com deleção gênica para essa proteína produzem enterocolite espontânea (Ho *et al.*, 2006). Entretanto, a possível participação do gene DLG5 surgiu de pesquisas realizadas por Stoll *et al.*, (2004) em pacientes europeus com diagnóstico de IBD. Nesses pacientes foram descobertas mutações no gene DLG5 postulado como sendo importante na manutenção de células epiteliais e adequada permeabilidade intestinal. Mutações nesse gene aumentariam o risco para o desenvolvimento de IBD.

Intrinsecamente relacionados aos fatores ambientais e genéticos estão os que podem direcionar a resposta inflamatória; dentre esses se encontra o fator de transcrição nuclear κ B (do inglês *nuclear factor- κ B*, NF- κ B). Esse fator nuclear foi primeiramente identificado como sendo regulador da expressão do gene que codifica a cadeia leve chamada de kappa (daí a simbologia κ da sigla NF- κ B) em linfócitos B de murinos (Sen e Baltimore, 1986). Posteriormente, sua expressão foi identificada em diferentes tipos celulares. O NF- κ B, se apresenta comumente como um heterodímero que usualmente consiste de duas proteínas, a subunidade p65 (também chamada de relA) e a subunidade p50. Outras subunidades como rel, relB, vrel e p52, também são encontradas na forma ativa do NF- κ B e ativam diferentes genes. Em células não estimuladas, o NF- κ B é encontrado no citoplasma ligado a duas proteínas chamadas de I κ B α e I κ B β que impedem a migração desnecessária do NF- κ B para o núcleo celular (Baldwin, 1996). Na ocorrência de um estímulo específico, a proteína quinase IKK fosforila as proteínas I κ B, sinalizando para uma

subseqüente degradação proteosomal, e assim, o NF- κ B é direcionado até o núcleo, onde se liga em seqüências de regiões promotoras de genes específicos (Bauerle e Baltimore, 1996; Ghosh e Karin, 2002). Vários estímulos podem desencadear a ativação do NF- κ B, incluindo vírus, citocinas, proteínas quinases como a proteína quinase C (PKC), espécies reativas de oxigênio, dentre outros. Sua ativação está grandemente relacionada à ativação de genes para muitas citocinas, quimiocinas, enzimas e moléculas de adesão, todas importantes para a sinalização e perpetuação da inflamação (Barnes *et al.*, 1997; Ben-Neriah e Schmidt-Suppran, 2007). Contudo, muitos mediadores formados pela ativação do NF- κ B promovem nova ativação no NF- κ B, constituindo um sistema de amplificação e continuidade do processo inflamatório (Barnes *et al.*, 1997; Ben-Neriah e Schmidt-Suppran, 2007; Nenci *et al.*, 2007).

No que diz respeito à IBD, o NF- κ B aumenta a expressão de enzimas como a sintase do óxido nítrico indutível (do inglês *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) em células epiteliais do cólon em pacientes com UC (Lundberg *et al.*, 1994). Outro exemplo de regulação pelo NF- κ B é o aumento da expressão da ciclooxigenase-2 com conseqüente aumento da produção de prostaglandinas em processos inflamatórios como a artrite sinovial e a IBD (Croffort *et al.*, 1994; Subbaramaiah *et al.*, 2004). O NF- κ B, em parte, é fundamental para que ocorra o recrutamento e a adesão de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T da circulação para o sítio da inflamação em doenças inflamatórias crônicas. Na IBD e em outras patologias, o NF- κ B regula a expressão de mais de 200 genes responsáveis pela transcrição de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão como às moléculas de adesão intercelulares 1 (do inglês *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM1) e moléculas de adesão de células vasculares (do inglês *vascular-cell adhesion molecule 1*, VCAM1)

e E-selectinas (Barnes e Karin, 1997). Desse modo, o papel do NF- κ B, na IBD tem sido revisto e trabalhos recentes, como o de Ben-Neriah e Schmidt-Supprian (2007), merecem destaque. Nesse estudo tem-se a idéia de que a estabilização do NF- κ B em experimentos realizados em animais com deficiência gênica para a IKK (IKK α , IKK β ou a IKK γ também conhecida como NEMO, do inglês NF- κ B *essential modulator*), conduz a um processo inflamatório redirecionado para a ativação de células dendríticas, com um aumento de citocinas como IL-12 e IL-23 que colaborariam para uma resposta do tipo T_H1, com produção de INF γ e IL-17, o que culminaria na ativação de macrófagos, acumulação de neutrófilos e dano tecidual.

Além disso, as citocinas desempenham um importante papel no direcionamento da resposta inflamatória na IBD. Essas realizam importantes funções na modulação do sistema imune. As citocinas são rapidamente sintetizadas e secretadas por células inflamatórias mediante estimulação e induzem a expressão de moléculas de adesão e a produção de outros mediadores inflamatórios (Cominelli, 2004). As citocinas que têm merecido maior atenção na última década em relação à IBD são: citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α e INF γ , bem como citocinas antiinflamatórias, como o antagonista do receptor da interleucina 1 (IL-1ra), IL-4, IL10, TGF β e IL-11 (para revisão ver: Rogler e Andus, 1998; Cominelli, 2004).

Muitas dessas citocinas constituem alvo potencialmente relevante para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. No entanto, as que trouxeram até o momento os melhores resultados são o TNF α e a IL-12. A terapia com anti-TNF α em pacientes com CD, utilizando o infliximab (anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF α), que aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1998, ou drogas como a talidomida (inibidor da produção de TNF α), não proporcionaram a

cura, mas permitiram a remissão da doença em muitos dos casos (Ehrenpreis *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Em relação à terapia com anti-IL-12, essa contribuiu para uma melhora significativa do quadro clínico de pacientes com CD (Mannon *et al.*, 2004). Entretanto, atualmente novas pesquisas estão sendo direcionadas a citocinas até então pouco exploradas na IBD, como a IL-7 e seu receptor IL-7R, uma vez que animais com deleção gênica para essa citocina não desenvolvem UC (para revisão ver: Ogata e Hibi, 2003) e a IL-23, que está sendo apresentada como a citocina que coordenaria as respostas imunes do intestino e seria a responsável pela perpetuação da inflamação intestinal (para revisão ver: Neurath, 2007).

Paralelamente ao estudo das vias pró-inflamatórias ou antiinflamatórias que envolvem as citocinas na IBD, outros estudos estão sendo conduzidos procurando avaliar alguns dos mecanismos intracelulares de ativação da resposta inflamatória, como por exemplo, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês *mitogen activated protein kinases*, MAPK). As MAPKs constituem a principal cascata pró-inflamatória abrangendo desde a membrana celular até o núcleo celular e, portanto, representam um importante alvo para a imuno-modulação. Estas são subdivididas em três principais módulos de sinalização: ERK1/2, JNK e p38-MAPK (Waetzig e Schreiber, 2003). A sinalização ERK 1/2 está envolvida na regulação do crescimento celular, na proliferação, na sobrevivência e em processos inflamatórios; já a sinalização através da JNK está envolvida na proliferação celular e na apoptose, enquanto que a via da p38-MAPK está associada com o crescimento celular, diferenciação, morte celular e o processo inflamatório (Waetzig e Schreiber, 2003). Além disso, foram encontrados altos níveis de expressão da JNK e da p38-MAPK em biópsias de intestino de pacientes com CD, quando em comparação com os respectivos controles (Waetzig *et al.*, 2001, 2002). Foi também demonstrado que o

tratamento de pacientes com CD com o inibidor CNI-1493 (um *gyanylhydrazone*, inibidor da p38-MAPK e da JNK) proporcionou significativa melhora clínica e atenuação da severidade da doença (Hommes *et al.*, 2002). Ademais, em trabalhos recentes, como o de Hollembach *et al.*, (2005) foi possível estabelecer uma importante relação entre a p38-MAPK e a UC - nesse trabalho, o tratamento com o SB 203580 (inibidor da p38-MAPK) em camundongos com colite experimental induzida por ácido-2,4,6 trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS) foi capaz de atenuar a resposta inflamatória de maneira significativa.

Investigações sobre a relação entre o óxido nítrico (NO) e a inflamação intestinal tiveram início nos anos 90. Entretanto, até o momento, são controversos os dados que indicam seus benefícios ou malefícios. No trato gastrointestinal o NO é grandemente sintetizado pelas enzimas eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) e também pela iNOS (óxido nítrico sintase indutível), presente constitutivamente pois, o tubo digestivo é exposto diretamente a antígenos e a diversos produtos bacterianos que funcionam como estímulo para sua indução (Nathan e Xie, 1994). No trato gastrointestinal, o NO possui diversas funções, contudo a mais relevante é a de modular a permeabilidade da mucosa intestinal (Kubes, 1992). Quanto à IBD, os dados mais substanciais se referem à iNOS e seu papel no processo inflamatório intestinal. Em trabalhos com modelo animal (cobaia) de colite induzida por TNBS os resultados indicam que o tratamento oral com a *N^G-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME) diminuiu todos os sinais inflamatórios avaliados, como adesão tecidual, ulceração e migração celular (Miller *et al.*, 1993). Já no modelo de colite espontânea com o macaco *Rhesus*, o inibidor *N⁶-(1-Iminoethyl)-L-lysine hydrochloride* (L-NIL) proporcionou a redução da diarreia (Ribbons *et al.*, 1995). Entretanto, pesquisas

complementares foram realizadas incluindo não somente a iNOS mas a eNOS e a nNOS, na tentativa de se elucidar o papel do NO na colite. O trabalho de Sasaki *et al.*, (2003), utilizando camundongos com deleção gênica para a eNOS (eNOS^{-/-}), sugere um papel fundamental da eNOS na proteção contra os danos da mucosa intestinal e na diminuição da exacerbada migração celular no modelo de colite por dextran sulfato de sódio (DSS); sugerindo assim, novos investimentos científicos para uma terapia que envolva a eNOS. No que se refere à eNOS, de modo interessante, também é descrito na literatura que indivíduos com IBD não apresentam sua expressão alterada quando comparado com indivíduos saudáveis (Dijkstra *et al.*, 1998; Kubes e MacCafferty 2000; Sasaki *et al.*, 2003). Quanto à nNOS, é demonstrado na literatura seu papel protetor na colite por DSS em camundongos, uma vez que animais com deleção gênica para essa enzima apresentam quadros de colite severa (Beck *et al.*, 2004).

A regulação das funções intestinais é delineada por uma série de sistemas que permeiam várias classes de neurotransmissores e neuromoduladores. Os neuropeptídeos como a substância P (SP), a neurocinina A (NKA), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o neuropeptídeo Y, participam do controle da motilidade, da secreção de eletrólitos e fluídos, na circulação e na homeostasia tecidual intestinal. Fármacos que modulam o sistema de taquicininas (juntamente com seus receptores NK₁, NK₂ e NK₃) e o CGRP têm despertado grande interesse quanto à IBD, pois, estes são conhecidos por ações antiespasmódicas, antidiarréicas, antiinflamatórias e no alívio da dor visceral (para a revisão ver: Holzer, 1998). Alguns poucos estudos têm demonstrado que na colite experimental, antagonistas para os receptores NK₁ e NK₃ possuem efeitos benéficos na proteção contra o dano tecidual, na redução da diarreia, na

diminuição da hiperalgesia e na redução significativa da infiltração de neutrófilos (Stucchi *et al.*, 2000; Moriarty *et al.*, 2001).

1.2. O sistema calicreína-cininas e o trato gastrointestinal

1.2.1. Histórico das cininas

Os primeiros registros sobre as ações das cininas surgiram em 1909, quando Abelous e Bardier (1909) descreveram que a injeção endovenosa de uma fração da urina humana insolúvel em álcool produzia queda transitória da pressão sanguínea em cães. Entretanto, somente anos mais tarde, com os trabalhos de Frey *et al.*, (1926), foi verificada que essa fração da urina humana gerava hipotensão em diferentes espécies animais. Contudo, esse efeito hipotensor foi atribuído na época a uma substância caracterizada por ser termolábil e não dializável presente na urina. Estudos posteriores de Kraut *et al.*, (1930) denominaram tal substância como sendo um hormônio circulante encontrado principalmente em órgãos como o pâncreas. Posteriormente, essa substância foi chamada de calicreína (do grego: *kallikreas* para pâncreas). Werle *et al.*, (1937) observaram que a calicreína, quando incubada no plasma, liberava uma potente substância estimuladora do músculo liso, sendo que essa substância não era derivada da quebra da calicreína, mas sim, da quebra de uma proteína plasmática; dessa forma, foi concluído que este produto farmacologicamente ativo era liberado de um precursor através da ação proteolítica da enzima calicreína. Esse produto com atividade farmacológica foi denominado de calidina.

Anos mais tarde, Rocha e Silva *et al.*, (1949) observaram que a incubação do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, ou de tripsina, com a fração pseudoglobulina do plasma, causava a liberação de um potente agente hipotensor e contracturante. Esse novo agente foi definido como sendo um polipetídeo produzido por ação enzimática, a partir de proteínas plasmáticas. Essa nova substância produzia uma resposta contrátil lenta em relação àquela causada por histamina ou acetilcolina, quando avaliada em preparações de íleo isolado de cobaia. Desse modo, os autores sugeriram o nome bradicinina (BK) para definir esse novo agente (do grego: *bradys* para lento; *kinesia* para movimento). Na realização de novas pesquisas, Werle e Maier, (1952) observaram que a BK e a calidina (Lys-BK) eram formadas em condições similares e apresentavam as mesmas ações farmacológicas, sugerindo que ambas poderiam estar relacionadas ao mesmo substrato. Posteriormente, Boissonas *et al.*, (1960), na tentativa de elucidar a similaridade da BK e da Lys-BK, determinaram a seqüência correta para a BK e assim, sintetizaram o nonapetídeo composto por: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Desse modo, com a possibilidade de se produzir BK sinteticamente, iniciou-se a caracterização fisiológica e farmacológica da BK e seus análogos.

Os primeiros estudos realizados demonstraram que a BK produzia contração em diversas preparações com musculatura lisa, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor (Lewis, 1964). Contudo, o processo rápido de inativação das cininas na circulação levou ao desenvolvimento de substâncias capazes de inibir a atividade das cininases. Inicialmente verificou-se que o veneno extraído da serpente *Bothrops jararaca* era capaz de potencializar a contração do íleo de cobaia ou a resposta hipotensora causada pela BK (Ferreira, 1965). O fator responsável por este efeito foi chamado de fator potencializador da BK e sua

atividade foi correlacionada com a inibição da inativação enzimática das cininas (Ferreira e Vane, 1967). A partir desse fator foi desenvolvido o primeiro inibidor da cininase II, o captopril (Ondetti *et al.*, 1977).

Entretanto, somente em 1980 foi determinado que as ações das cininas são mediadas pela ativação de receptores específicos localizados na membrana celular. Esses receptores foram denominados B₁ e B₂, sendo essa classificação proposta por Regoli e Barabé (1980), com base na determinação da ordem de potência dos seus agonistas em diversos tecidos isolados. Atualmente, são descritos inúmeros outros papéis relevantes para a BK e outras cininas a ela relacionadas (Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; Gabra *et al.*, 2003; Marceau e Regoli, 2004).

1.2.2. Síntese e degradação das cininas

As cininas são formadas em resposta a estímulos fisiológicos, ou durante o processo inflamatório, a partir de precursores denominados cininogênios, que podem ser α -globulinas de alto peso molecular (120 KDa) ou de baixo peso molecular (66 KDa), através da ação de enzimas chamadas de cininogênases conhecidas também como calicreínas (Bhoola *et al.*, 1992). A ação da calicreína plasmática sobre o cininogênio de alto peso molecular resulta na formação do nonapeptídeo BK. No entanto, a calicreína tecidual pode agir sobre cinogênios de alto e baixo peso molecular, originando o decapeptídeo calidina (Lys-BK). A calidina pode ser convertida em BK através da clivagem da porção N-terminal, pela ação da aminopeptidase plasmática (Steranka *et al.*, 1988).

Uma vez formadas, as cininas circulantes se difundem através da parede dos vasos linfáticos aos tecidos, onde são rapidamente inativadas por várias peptidases,

denominadas de cininase I, cininase II e encefalinase. O grupo das cininases I é representado pelas enzimas carboxipeptidase N (plasma) e carboxipeptidase M (membrana), as quais removem o aminoácido arginina da porção C-terminal das moléculas de BK e da calidina, formando os compostos ativos des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente (Erdös, 1990; Marceau, 1995). Por outro lado, a cininase II é responsável por clivar o dipeptídeo da porção C-terminal da BK, transformando-a em um metabólito inativo (Bhoola *et al.*, 1992). E por último, a encefalinase ou endopetidase neutra, uma metalopeptidase presente especialmente em células epiteliais, capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da molécula da BK, de maneira semelhante à cininase II (para revisão ver: Proud e Kaplan, 1988; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

1.2.3. Os receptores para as cininas

As cininas, depois de formadas, exercem suas ações através da interação com receptores de membrana denominados B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980; Pesquero *et al.*, 1996). Os receptores para as cininas pertencem à família de receptores compostos por sete unidades transmembranares regulados e acoplados à proteína G (Menke *et al.*, 1994; Pesquero *et al.*, 1996). No entanto, apesar de serem acoplados aos mesmos mecanismos transduccionais, os receptores B₁ e B₂ apresentam somente 36% de homologia na seqüência de aminoácidos, sendo essa homologia mais evidente nas regiões transmembranares (Marceau *et al.*, 1997; Hess *et al.*, 2001). Os receptores do tipo B₁ são ativados preferencialmente pelos fragmentos des-Arg⁹-BK e pela des-Arg¹⁰-calidina produzidos a partir da degradação da BK e da calidina, respectivamente. Os receptores B₁, comumente não são

expressos de forma constitutiva (com poucas exceções). Dessa forma, apresentam a capacidade de serem induzidos em certas ocasiões como o trauma tecidual, longos períodos de incubação *in vitro*, infecções, após tratamento com endotoxinas bacterianas, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico ou durante a inflamação crônica como a IBD (Marceau e Bachvarov, 1998; Ahluwalia e Perretti, 1999; Calixto *et al.*, 2000; Stadnicki *et al.*, 2005). A indução dos receptores B₁ pode ser observada na maioria das preparações *in vitro* com ou sem a adição de um agente indutor (como por exemplo, o LPS). Na literatura é referida a indução desses receptores em diversos tecidos, como íleo e aorta de ratos, cólon humano e íris de porco (Marceau, 1995; Medeiros *et al.*, 2004; El Sayah *et al.*, 2006).

Diferentemente dos receptores B₁, os receptores B₂ estão distribuídos ao longo dos sistemas nervoso central e periférico de maneira constitutiva (Hall e Morton, 1997) e medeiam várias respostas fisiológicas (contração da musculatura lisa, vasodilatação, broncoconstrição, hipotensão, dor e hiperalgesia) induzidas pela BK. As ações fisiológicas das cininas e seus respectivos receptores, principalmente, o envolvimento desses em diversas patologias, tem sido verificado através da utilização de antagonistas e radioligantes. Os primeiros antagonistas seletivos e competitivos para os receptores B₂ tiveram sua estrutura baseada no protótipo [D-Phe⁷]-BK (Vavrek e Stewart, 1985). Posteriormente, houve a síntese de antagonistas como o Hoe 140 (conhecido como icatibante), NPC17731 e o NPC17761 (Kyle *et al.*, 1991). Na última década, foram desenvolvidos os antagonistas não peptídicos seletivos para o receptor B₂, entre eles o WIN64338, o FR173657, o FR167344, o FR190997, o NPC18884 e o bradizide (Sawutz *et al.*, 1994; Griesbacher *et al.*, 1998; De Campos *et al.*, 1999; Gobeil *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Burgess *et al.*,

2000; Griesbacher e Legat, 2000; Stewart, 2003; Campos *et al.*, 2006); testados principalmente em processos inflamatórios e como agentes anti-câncer.

Do mesmo modo, também foi de fundamental importância para o estudo dos receptores B₁ a síntese de antagonistas seletivos. O primeiro antagonista seguiu o protótipo [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK (Regoli *et al.*, 1977; Regoli e Barabé, 1980); e sendo assim, novos antagonistas surgiram como o [des-Arg¹⁰]-HOE140 e a des-Arg⁹-NPC17731, o R715, o B9958 e o antagonista misto B₁/B₂, o B9430 (Stewart *et al.*, 1999; Regoli *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2006). Recentemente, uma nova geração de antagonistas (quarta geração) para o receptor B₁ tem despertado grande interesse. Esses compostos caracterizam-se pela natureza não peptídica, por produzirem ações duradouras e por terem viabilidade para o tratamento oral. Fazem parte dessa nova classe de antagonistas do receptor B₁ das cininas o composto benzodiazepínico 1 (BZ-1), os compostos dihidroquinoxalinona, o 2,3-diaminopiridina, o SSR240612, o 2-alkilamina-5-sulfamoylbenzamida e o LF220542 (Wood *et al.*, 2003; Gougat *et al.*, 2004; Kuduk *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004; Ritchie *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Porreca *et al.*, 2006). Interessantemente, o conjunto dos antagonistas do receptor B₁ conta com um antagonista de origem natural o composto Velutinol A (também conhecido como MV08), que apresentou características anti-edematogênicas e antinociceptivas quando testado em modelos animais (Calixto *et al.*, 1998; Mattos *et al.*, 2006a e 2006b; Campos *et al.*, 2006).

Ademais, estudos de união específica (*binding*) com radioligantes como o [³H]-BK, ligante do receptor B₂ e o [³H]-des-Arg¹⁰-calidina, ligante do receptor B₁, tem contribuído grandemente para a caracterização das propriedades farmacológicas desses receptores em diversas preparações teciduais e em cultura de células (Hess, 1997; Hall e Morton, 1997). Complementarmente, estudos de biologia molecular e

seqüenciamento de genes realizados por McEachern *et al.*, (1991) culminaram com a identificação e clonagem do receptor B₂ a partir do DNA complementar (cDNA) obtido do útero de ratas. Em seguida, este receptor foi clonado em humanos e em camundongos (Menke *et al.*, 1994; Pesquero *et al.*, 1996). O receptor B₂ clonado em humanos apresenta uma seqüência de 364 aminoácidos, possuindo 81 a 84% de homologia com os receptores do rato e do camundongo. O receptor B₁ foi clonado em humanos (Menke *et al.*, 1994) e posteriormente clonado em coelhos, camundongos, ratos, cães e macacos, apresentando uma homologia de 69 a 97% na seqüência de aminoácidos (MacNeil *et al.*, 1995; Pesquero *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2001, 2002; Prado *et al.*, 2002). Os receptores B₁ e B₂ foram mapeados em humanos, no cromossomo 14q32.

Após os estudos de clonagem e seqüenciamento dos receptores B₁ e B₂, foi possível o desenvolvimento de linhagens de camundongos com deleção gênica para esses receptores. Os estudos posteriores a esse advento constataram que os receptores B₂ são importantes para o processo de inflamação, hiperalgesia, contração e relaxamento da musculatura lisa e na modulação da pressão arterial (Borkowski *et al.*, 1995; Boyce *et al.*, 1996). Já, a deleção do receptor B₁ permitiu constatar sua importância no desenvolvimento de respostas dolorosas e inflamatórias (Pesquero *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005).

1.2.4. Receptores para as cininas e suas vias de transdução

As respostas funcionais mediadas pelos receptores das cininas podem envolver múltiplas vias de transdução e sistemas de segundos mensageiros. Os receptores B₁ e B₂ para as cininas são preferencialmente acoplados ao mesmo tipo

de proteína G α i e G α q (Gutowski *et al.*, 1991; Prado *et al.*, 2002) e na maioria das vezes sua ativação está relacionada com a estimulação da fosfolipase C, com conseqüente formação de inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O aumento dos níveis de IP₃ resulta em influxo de cálcio intracelular enquanto que a formação de DAG promove ativação de isoformas específicas da proteína quinase A e C (Schanstra *et al.*, 1999). Os eventos celulares estimulados pelos receptores para cininas podem ainda envolver a mobilização de cálcio, ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio, transporte de íons cloreto, a ativação da adenil ciclase, formação de NO, aumento expressivo dos níveis de prostanóides em resposta à ativação da fosfolipase A₂ ou, ainda, ativação da via colinérgica e de proteínas específicas como as MAPKs (Fuller *et al.*, 1987; Reynolds *et al.*, 1999; Schanstra *et al.*, 1999; Gabra *et al.*, 2003). Ademais, outros trabalhos demonstraram que a ativação dos receptores B₁ e B₂ pode resultar na estimulação de outras quinases, como tirosina-quinase, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a esfingosina-6-quinase (Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001).

1.2.5. Indução dos receptores B₁

Como mencionado anteriormente no item (1.2.3.), a indução dos receptores B₁ tem sido evidenciada em diversas condições *in vitro* e *in vivo*, e pode ser observada em preparações *in vitro* obtidas de coelhos, ratos, camundongos, suínos e também de humanos (Marceau *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). A resposta funcional mediada através do receptor B₁ parece depender da síntese *de novo* de proteínas, uma vez que na primeira hora de avaliação, comumente, essa resposta funcional está ausente; sendo também essa resposta bloqueada em tecidos tratados

com inibidores de transcrição de RNA e de tradução protéica (Campos e Calixto, 1994; Haddad *et al.*, 2000; Sardi *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos *in vitro* mostram que certas citocinas (TNF α), fatores de crescimento e agentes como LPS (o qual leva a síntese de citocinas) amplificam a resposta mediada pelos receptores B₁, em conseqüência do isolamento tecidual e da incubação *in vitro* (McLean *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004). Alguns compostos, como o LPS, causam a expressão do receptor B₁ quando administrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (McLean *et al.*, 1999; Calixto *et al.*, 2004).

Desta forma, tem sido sugerido que o fenômeno de indução do receptor B₁ envolve a ativação de fatores transcricionais, incluindo o fator nuclear NF- κ B. Dados da literatura têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias ou o LPS induzem a fosforilação do inibidor endógeno I κ B, promovendo a ativação do NF- κ B, modulando a síntese dos receptores B₁ (Passos *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2004). Esse dado passou a ser confirmado na identificação de sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como AP-1, CREB e NF- κ B, na região promotora do gene do receptor B₁ (Ni *et al.*, 1998; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

1.2.6. As cininas e a IBD

As ações das cininas no trato gastrointestinal têm sido demonstradas não somente em animais como o rato e o gato, mas também em humanos (para revisão ver: Clements, 1989). As cininas estão envolvidas em diferentes processos no trato gastrointestinal como a secreção de água e eletrólitos, no transporte de íons através do epitélio, causando aumento da permeabilidade, vasodilatação capilar, na estimulação sensorial, hiperalgesia, na motilidade intestinal e na estimulação da

produção de eicosanóides e NO (Cuthbert e Margolius, 1982; Gaginella e Kachur, 1989; Chen *et al.*, 1995; Stadnicki, 2005b). Devido às ações exercidas pelas cininas no trato gastrointestinal e principalmente decorrente de suas respostas inflamatórias, nos últimos anos alguns trabalhos tentaram relacionar o sistema caliceínas-cininas com doenças intestinais como a CD e a UC. Inicialmente, no trabalho de Zeitlin e Smith (1973), foi demonstrada a presença de caliceínas na fase aguda da UC em humanos e sugerida sua participação nessa patologia. Anos mais tarde, Stadnick *et al.*, (1996) comprovaram a melhora da inflamação intestinal em ratos com a utilização do inibidor P8720, específico para caliceínas do plasma. Posteriormente, trabalhos como o de Arai *et al.*, (1999) e Kamata *et al.*, (2002) demonstram que o tratamento de animais com o antagonista Hoe140 ou com o FR173657 em diferentes estudos de inflamação intestinal (colite e enterocolite), ambos os antagonistas, foram capazes de atenuar o processo inflamatório, causar diminuição do infiltrado celular e redução da mortalidade.

Além disso, estudos realizados recentemente por Stadnick *et al.*, (2005) investigaram a expressão do RNAm e a localização dos receptores para as cininas em biópsias de intestino humano, inflamado ou não. Nesse estudo foi constatada a presença de ambos os receptores B₁ e B₂ no epitélio intestinal não inflamado (sugerindo um papel fisiológico não somente para o receptor B₂, mas também para o receptor B₁), a expressão desses receptores nos enterócitos com localização apical dos receptores B₁, o aumento significativo da expressão do RNAm para o receptor B₁ quando comparado com o receptor B₂, o aumento significativo na concentração protéica do receptor B₁ na UC evidenciado pela imunohistoquímica. Desse modo, foi sugerido que o receptor B₁ parece exercer um papel importante na IBD e que as

cininas podem constituir um novo e promissor alvo terapêutico para essa doença (Stadnick *et al.*, 2005).

1.3. Modelos animais para o estudo da IBD

Modelos animais de CD e de UC têm colaborado de maneira importante para o entendimento da inflamação intestinal. Esses modelos são divididos em quatro categorias: modelos de colite espontânea, modelos de colite induzida em camundongos com respostas imunes normais (como o emprego do TNBS), modelos de transferência adaptativa e modelos de modificação genética (deleção gênica e transgenia) como descritos na **Tabela 1** (Hibi *et al.*, 2002; Borm e Bouma, 2004).

Tabela 1. Modelos animais de inflamação intestinal crônica

Modelos de modificação genética

Modelos de deleção gênica em camundongos

IL-2 e IL-2R α ; IL-10; STAT3; camundongo mutante para o receptor de célula T TNF-3' UTR; *Trefoil factor* (fator que confere proteção à mucosa)

Modelos de camundongos e ratos transgênicos

IL-7; STAT-4; HLA B27(rato)

Modelos de colite espontânea

Camundongos: C3H/HeJBir; SAMP/Yit. Macacos: *Rhesus monkey*

Modelos de colite induzida

TNBS; Oxazolona; DSS; Carragenina; peptidoglicano-polisacarídeo

Modelos de transferência adaptativa

Transferência de células T CD4⁺/CD45RB

Células T CD8 específicas-hsp 60

IL, interleucina; IL-R, receptor para interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; UTR, região *untranslated* (não traduzida); hsp, proteínas *heat-shock*. Tabela adaptada de Hibi *et al.*, (2002).

Apesar de suas limitações, de forma geral, essas técnicas têm contribuído para o entendimento dos mecanismos imunológicos, patológicos e fisiológicos, além de serem importantes ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, mesmo que muitos destes modelos sejam de grande valor para a análise experimental dos mecanismos envolvidos na IBD, poucos deles parecem reproduzir a IBD observada em pacientes. Por esse motivo, o desenvolvimento de novos modelos que permitam avaliar as alterações da IBD principalmente quanto à cronicidade da doença ainda são necessários (Bouma e Strouber, 2003).

O modelo experimental escolhido para a realização deste trabalho foi o de colite induzida quimicamente por TNBS; idealizado inicialmente por Wallace *et al.*, (1989), é realizado pela administração intra-colônica da mistura de dois diferentes compostos, o etanol, que tem a função de quebrar a barreira epitelial, e o agente TNBS, um composto ácido inorgânico conhecido como um hapteno, que ao se ligar a proteínas teciduais de alto peso molecular torna-se nocivo e desencadeia uma série de respostas imunológicas.

1.4. Os tratamentos da IBD

O tratamento da CD e da UC depende de fatores distintos que incluem principalmente a localização intestinal, a severidade e a presença ou não de complicações (úlceras e necrose tecidual). O tratamento de cada paciente deve ser individualizado, baseado na sintomatologia e na tolerância aos medicamentos. As terapias hoje disponíveis tratam a fase aguda das doenças e mantêm a remissão, mas não curam definitivamente. Em casos como os de lesões pré-cancerígenas ou

complicações supurativas (que podem levar à sepse) é aconselhada intervenção cirúrgica (Lichtenstein *et al.*, 2006; Baumgart e Carding, 2007).

Muito se tem investido na procura de uma terapêutica eficaz para o tratamento da IBD. Contudo, as medicações existentes ainda não permitem um tratamento satisfatório (Baumgart e Carding, 2007). Entre as alternativas terapêuticas destacam-se: os aminosalicilatos, (compostos que liberam o ácido 5-amino-salicílico) que correspondem à primeira classe de fármacos utilizados na IBD, por suas ações antiinflamatórias, (Podolsky, 2002); os corticosteróides, potentes agentes antiinflamatórios (Amsterdam *et al.*, 2002; Lichtenstein *et al.*, 2006); os compostos imunomoduladores azatioprina (AZA) ou 6-mercaptopurina (6-MP), utilizados comumente após a terapia dos corticosteróides para manutenção da remissão da doença (Lennard, 1992; Lichtenstein, 2004); o metotrexato, (desenhado a partir da estrutura tridimensional da enzima dihidrofolato redutase) (Feagan *et al.*, 1995; Lichtenstein *et al.*, 2006); o micofenolato mofetil (MMF), inibidor da proliferação de linfócitos por ser bloqueador seletivo da síntese de nucleotídeos de guanosina (inibição da síntese de purinas e pirimidinas) em células T (Papadimitriou *et al.*, 2003; Dalle *et al.*, 2005); a ciclosporina, descoberta nos anos 70, a qual revolucionou a terapia que tornava possível os transplantes de órgãos foi capaz de proporcionar a manutenção da remissão da IBD sendo necessária sua administração juntamente com 6-MP ou AZA (Cohen, 2001); na mesma linha de ação farmacológica demonstrada para a ciclosporina, encontra-se o tacrolimus (FK506), um derivado de *Streptomyces* com atividade imunossupressora, utilizado somente nos casos onde há intolerância à ciclosporina (Lowry *et al.*, 1999); a talidomida, composto utilizado inicialmente como sedativo e anti-emético o qual possui atividade anti-inflamatória e imunomoduladora sendo também um importante

inibidor da produção de TNF α (Ehrenpreis *et al.*, 1999); o infliximab, um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF α , que representa uma das alternativas terapêuticas mais promissoras, pois, em muitos pacientes (não na totalidade) proporciona a redução dos sintomas da CD e da UC, bem como promove a manutenção da remissão desses sintomas (Rutgeerts *et al.*, 2004); e finalmente os antibióticos e pró-bióticos, que servem para tratar e prevenir a IBD.

Por outro lado, o acesso à terapêutica disponível nem sempre é fácil, o que tem causado grande interesse científico e clínico no desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais efetivos, seguros e baratos para o tratamento e a manutenção da remissão da IBD (Lichtenstein *et al.*, 2006; Baumgart e Carding, 2007). Interessantemente, estudos recentes (para revisão ver: Stadnicki, 2005) passaram a introduzir o conceito de que o sistema calicreína-cininas pode contribuir de maneira importante na patogênese da CD e da UC, por ser fisiologicamente importante para as funções intestinais e por suas ações nos processos inflamatórios e dolorosos; sendo que os receptores B₁ e B₂ estão presentes e possuem suas expressões aumentadas no epitélio intestinal quando este se encontra inflamado. Essas observações sugerem uma maior investigação acerca do papel das cininas e seus receptores no trato gastrointestinal e propõem também, o envolvimento das cininas na IBD.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar, através de estudos farmacológicos, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelos agonistas dos receptores B₁ e B₂ para as cininas, em preparações de cólon isolado de camundongos, bem como investigar, com o emprego de técnicas bioquímicas e de biologia molecular a possível participação das cininas na colite experimental induzida por TNBS.

2.2. Objetivos específicos

- ☞ Caracterizar, através do uso de agonistas e antagonistas seletivos, alguns dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos;

- ☞ Avaliar o perfil temporal do aumento da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos;

- ☞ Estudar, as respostas funcionais, a densidade, o RNAm para os receptores B₁ e B₂ durante a colite induzida por TNBS, bem como investigar a participação desses receptores na gênese da UC em camundongos;

☞ Investigar, com o emprego de inibidores seletivos, a possível participação da síntese protéica, da via fosfatidilinositol-3-quinase γ (PI3K γ), do NF- κ B, do TNF α , e da iNOS na indução do receptor B $_1$, na colite induzida por TNBS em camundongos;

☞ Analisar, com o emprego de inibidores de enzimas e de canais iônicos, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg 9 -BK em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para os experimentos, foram utilizados camundongos *Swiss* machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, pesando entre 30 e 40 g. Além disso, utilizou-se camundongos machos com deleção gênica para os receptores B₁ ou B₂ para as cininas (B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-}, respectivamente) (Pesquero *et al.*, 2000), obtidos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α (TNF p55^{-/-}) (Rothe *et al.*, 1993) ou para a enzima iNOS (iNOS^{-/-}) (MacMicking *et al.*, 1995), obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Camundongos machos, selvagens da linhagem C57/BL6 foram utilizados como controle.

Os animais foram mantidos em câmaras individualizadas com ar filtrado ALESCO[®], com temperatura e umidade controladas (22 \pm 1°C, 60 a 80% de umidade), em ciclo claro escuro de 12 h, com livre acesso a ração marca BioBase[®] e água filtrada. Os animais *Swiss* tiveram um período de adaptação no biotério laboratorial de uma semana, já os com deleção gênica permaneceram no biotério laboratorial desde sua chegada até a fase experimental. Os experimentos foram realizados geralmente entre as 8 e 18 h, a temperatura de 24-25°C.

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo seguiram as recomendações do Guia de Uso e Cuidados com Animais Laboratoriais do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (NIH, Publicação número 85-23, revisado em 1996) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de

Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, Protocolo PP00032, 2006).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DAS CININAS *IN VITRO* EM CÓLONS DE CAMUNDONGOS

3.2.1. Montagem dos cólons para estudo *in vitro*

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida os cólons (4 cm) foram cuidadosamente removidos e posicionados em uma placa de vidro coberta com papel filtro umedecido com solução de Krebs-Henseleit (mM: NaCl, 113; KCL, 4,7; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25; MgSO₄, 1,1; KH₂PO₄, 0,9 and D-glucose, 11; pH 7.4) aquecida à 37° C para remoção dos resíduos fecais e retirada dos tecidos conectivos.

Para a montagem dos seguimentos de cólon na câmara para órgão isolado, manteve-se a integridade do órgão (não foram abertos longitudinalmente) e porções de 1,5 cm localizadas preferencialmente na região mediana do cólon, foram montadas verticalmente em cubas individuais, banhadas com solução de Krebs-Henseleit mantida à 37° C em um volume de 5 ml. O sistema manteve-se constantemente aquecido e aerado com uma mistura carbogênica (5% de CO₂ em 95% de O₂). As preparações foram submetidas a um período de equilíbrio de pelo menos 45 min durante o qual a solução do banho foi renovada a cada 15 minutos. Durante o experimento, os órgãos foram mantidos sob uma tensão basal de 1g. As variações de tensão isométrica (contrações) foram registradas através de transdutores F-60 (Narco Biosystems®) em polígrafo. Os experimentos foram

realizados com no mínimo seis animais por grupo, sendo que cada cólon rendeu no máximo duas preparações.

Para a verificação da viabilidade das preparações de cólon, realizou-se previamente curvas concentração-resposta cumulativas para o carbacol (CCh) através das quais determinou-se o valor ideal (100% de contração ou resposta máxima $R_{máx}$). A concentração de CCh que proporcionou uma resposta homogênea e reprodutível foi a de 100 μ M, passando a ser adotada em todos os experimentos subseqüentes para a certificação da viabilidade dos tecidos.

Todos os experimentos com a BK ou com seus peptídeos análogos foram realizados na presença de captopril (3 μ M), por 20 min, a fim de evitar sua degradação pela ação da cininase II.

3.2.2. Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas em cólons de camundongos

Após a montagem dos cólons e decorrido o período de equilíbrio, verificação e registro da viabilidade dos mesmos, as preparações foram lavadas com solução de Krebs-Henseleit por no mínimo três vezes até o retorno à linha de base. Curvas concentração-resposta baseadas no método cumulativo de Van Rossum, (1963) foram obtidas para a BK (0,1-10.000 nM) ou para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em 90 min. Com o objetivo de estabelecer um número máximo de curvas por experimento para a BK (0,1-10.000 nM) e verificar o fenômeno de dessensibilização dos receptores B₂, foram realizadas, curvas concentração-resposta cumulativas consecutivas em 90, 180 e 270 min após a montagem dos tecidos.

Na tentativa de se estabelecer a ordem das respostas máximas dos agonistas para cininas, curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para os agonistas seletivos dos receptores B₂ para as cininas: BK, Hyp³-BK, Lys-BK, Met-Lys-BK, Tyr⁸-BK e dos receptores B₁ des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM).

Em outra série de experimentos, com o objetivo de verificar quais subtipos de receptores estariam envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela BK no cólon de camundongo, foram realizadas após o período de equilíbrio, curvas concentração-resposta cumulativas para a BK, na ausência ou presença dos antagonistas seletivos para o receptor B₂ Hoe 140 (3-30 nM), FR173657 (10-100 nM) ou do receptor B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 µM) (Drummond e Cocks, 1995; El Sayah e Calixto, 2003a). Os antagonistas foram adicionados 10 min antes da realização das curvas cumulativas aos agonistas.

3.2.3. Caracterização funcional dos possíveis mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos

3.2.3.1. Participação do cálcio extracelular e de canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK no cólon de camundongos

A fim de avaliar a contribuição do cálcio externo na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos, após a obtenção de uma curva concentração-resposta cumulativa para BK, (curva controle) em solução de Krebs-Henseleit contendo cálcio, as preparações passaram a receber uma solução de Krebs-Henseleit modificada, ausente de cálcio e contendo o quelante de cálcio etilenoglicol-bis (β-amino-etil éster) (EGTA 1 mM). Os cólons permaneceram nesta

nova solução nutritiva por 20 min sendo renovada a cada 5 min. Em seguida, realizou-se uma curva concentração-resposta à BK, nesse meio modificado. Após o registro dessa curva, as preparações foram novamente transferidas para a solução de Krebs-Henseleit com cálcio, por cerca de 40 min, e realizou-se uma nova curva concentração-resposta à BK (0,1-10.000 nM) (Campos e Calixto, 1994).

Em outro grupo experimental, avaliou-se também a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos. Para tanto, curvas concentração-resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM) foram obtidas na ausência e na presença de nicardipina (antagonista de canais de cálcio do tipo L, 1 μ M) ou ω -conotoxina GVIA (bloqueador seletivo de canais de cálcio do tipo N, 0,1 μ M). As drogas foram pré-incubadas nas preparações por 20 min, em experimentos distintos (El Sayah e Calixto, 2003b).

3.2.3.2. Envolvimento do sistema colinérgico e de canais de sódio nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Com o intuito de avaliar o possível envolvimento da transmissão colinérgica nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos, as preparações foram incubadas com a atropina (agente anticolinérgico, 1 μ M). Em outro grupo experimental, a fim de verificar a participação de canais de sódio as preparações de cólon foram incubadas com o bloqueador de canal de sódio, a tetrodotoxina (TTX) (1 μ M) (El Sayah e Calixto, 2003a). Ambas as drogas foram incubadas por 20 min, e em seguida foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM).

3.2.3.3. Participação dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Para analisar o envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, as preparações de cólons foram incubadas primeiramente com a indometacina (inibidor não seletivo para COX-1 e 2, 1 μ M) ou com o rofecoxibe (inibidor seletivo da COX-2, 1 μ M). A seguir, utilizou-se o SC 560 (inibidor preferencial da COX-1, 1 μ M) e também o MK 571 (antagonista seletivo para o receptor de leucotrieno D₄, 100 nM) (Cabrini *et al.*, 1995; El Sayah e Calixto, 2003a). Em grupos experimentais diferentes, as drogas mencionadas foram incubadas durante 20 min, decorrido esse período realizou-se curvas concentração-resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM).

3.2.3.4. Influência dos neuropeptídeos e o CGRP nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Com o objetivo de verificar o papel dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK, em cólons de camundongos, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas na presença ou na ausência dos inibidores seletivos dos receptores NK1 (R116301, 100 nM), NK2 (SR 48968, 100 nM) e NK3 (SR 142801, 100nM). Em outro grupo experimental, investigou-se a participação do CGRP na resposta contrátil induzida pela BK através da utilização do fragmento (8-37) do CGRP (antagonista do receptor para o CGRP, 1 μ M) (Geppetti *et al.*, 1990). Em ambos os experimentos, as drogas foram incubadas por 20 min antes da realização das curvas concentração-resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM).

3.2.3.5. Estudo da contribuição dos receptores vanilóides nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores vanilóides nas respostas contráteis induzidas pela BK, as preparações de cólons foram incubadas, por 20 min com o antagonista competitivo dos receptores vanilóides, a capsazepina (1 μ M) ou com o SB 366791 (antagonista do receptor TRPV1, 10 μ M) (Andrade *et al.*, 2006). Posteriormente à incubação, foram realizadas as curvas concentração-resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM).

3.2.4. Estudo da indução *in vitro* do receptor B₁ para as cininas em preparações de cólons de camundongos

3.2.4.1. Avaliação temporal das respostas contráteis induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos

A fim de acompanhar a possível indução temporal do receptor B₁, cólons de camundongos foram montados em cubas para órgão isolado e desafiados com o agonista des-Arg⁹-BK (1 μ M) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas após a montagem das preparações. Os cólons foram testados frente ao agonista B₁ por somente uma única vez. As viabilidades dos tecidos foram testadas 30 minutos após a exposição ao agonista.

3.2.4.2. Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B₁ ou B₂ nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos

Com o objetivo de investigar o perfil farmacológico dos receptores B₁ e uma possível participação dos receptores B₂ na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK foram realizadas 6 horas após a montagem na ausência ou presença do antagonista seletivo para o receptor B₁ R 715 (1-10 nM) ou do antagonista dos receptores B₂ o FR 173657 (100 nM). Em outra série de experimentos, as preparações de cólons após 6 horas de montagem foram incubadas com os antagonistas seletivos para o receptor B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-BK (30 µM), o SSR 240612 (30 nM) e com o composto benzodiazepínico-1 (BZ-1) (30 nM) antes do desafio à des-Arg⁹-BK (1 µM) (Gougat *et al.*, 2004; El Sayah *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2006). Nesses experimentos, os antagonistas foram incubados nas preparações de cólons por 10 min e as viabilidades foram testadas 30 minutos após a utilização do agonista.

3.3. PADRONIZAÇÃO DA COLITE EXPERIMENTAL

3.3.1. Indução da colite experimental em camundongos

Para a indução de um quadro inflamatório no cólon, foi utilizado o modelo da colite ulcerativa induzida por TNBS. Este modelo experimental foi descrito anteriormente por Wallace *et al.*, (1989) e McCaferty *et al.*, (1999) e adaptado com algumas modificações às nossas condições experimentais. Na execução do protocolo experimental, os animais foram aleatoriamente divididos em grupos (n=6

animais), mantidos em jejum sólido total (sem ração e sem a realização de coprofagia) em caixas onde o fundo foi revestido com uma grade metálica. Os animais tiveram somente acesso *ad libitum* à solução de glicose 5%.

Após um período de jejum de cerca de 18-24 horas, os animais foram anestesiados com *2,2,2-tribromoethanol* (0,125 g/kg, i.p.) e então, uma cânula P50 de 4 cm conectada a uma seringa foi cuidadosamente inserida via intra-retal a qual alcançou todo o cólon. Para auxiliar a entrada da cânula, foi aplicado gel a base de água nos ânus dos animais. Para a indução da colite, 0,1 ml do composto TNBS (2,5 mg em 50% etanol), que tem o papel de quebrar a barreira epitelial intestinal, foi lentamente administrado dentro do lúmen do cólon. Em seguida, os animais foram posicionados de cabeça para baixo a 45° por 2 min e após a indução da colite, retornaram às caixas. Decorridas 8 horas após a realização da colite, os animais receberam ração e água filtrada.

3.3.2 Avaliação do dano macroscópico após a indução da colite experimental por TNBS

Após a indução da colite, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os cólons foram coletados e os tecidos conectivos retirados. Os cólons foram abertos longitudinalmente em toda a extensão, e cuidadosamente limpos internamente com solução salina (0,9%) pré-aquecida a 37°C utilizando-se hastes flexíveis com pontas de algodão. A severidade do dano no cólon foi avaliada usando-se uma escala de dano macroscópico (**Tabela 2**). Este sistema de avaliação de dano inclui características da presença de inflamação como: hiperemia, dano

visível (úlceras), diarreia, adesões, espessamento da parede e estreitamento do lúmen.

Tabela 2. Escala usada para avaliação do dano macroscópico na colite induzida por TNBS.

Grade numérica	Parâmetros
0	Ausência de danos
1	Hiperemia sem úlceras
2	Hiperemia e espessamento da parede do intestino sem a presença de úlceras.
3	Um sítio de úlceração sem espessamento da parede do intestino.
4	Dois ou mais sítios de úlceração ou inflamação.
5	0.5 cm de inflamação e presença de dano “importante”.
6-10	1 cm de dano “importante”. O score é aumentado em 1 para cada 0,5 cm de dano observado chegando ao máximo de 10.
0 ou 1	Ausência ou presença de diarreia
0 ou 1	Ausência ou presença de estreitamento (estreitamento do lúmen dificultando a passagem).
0,1, ou 2	Ausência ou presença de adesão média ou severa.

A partir da observação de cada cólon, a colite foi avaliada e quantificada. Método adaptado às nossas condições experimentais a partir de Wallace *et al.*,(1989) e McCafferty *et al.*,(1999).

O resultado foi o somatório equivalente ao dano observado, sendo esse chamado de escore (do inglês, *score*). Os cólons onde o *score* atingiu valores de 4 ou acima foram considerados como acometidos de colite.

3.3.2.1. Análise temporal do dano macroscópico após a indução de colite com TNBS em camundongos

No intuito de obter um *score* de colite como o evidenciado na literatura, realizou-se a indução da colite conforme descrito no item (3.3.1.). Após a indução, a

coleta dos cólons ocorreu em diferentes tempos de 6-96 horas. Em cada tempo realizou-se o *score* dos cólons coletados. Assim, os tecidos foram cuidadosamente limpos em solução salina pré-aquecida à 37°C, abertos no sentido longitudinal para a realização do *score* macroscópico. O animal controle correspondeu ao que recebeu somente solução salina (0,9%). Dessa forma, foi possível a identificação temporal dos *scores* de colite ulcerativa.

3.3.2.2. Características externas dos cólons com colite para posterior montagem no órgão isolado e viabilidade

Após a indução da colite como descrito anteriormente (3.3.1.), em 72 horas os cólons foram coletados, mergulhados em solução de Krebs-Henseleit aquecida, removidos os tecidos conectivos, cuidadosamente limpos (com o auxílio de uma pinça côncava), não foram abertos longitudinalmente e tiveram analisadas as suas características externas. A aparência do tecido foi de fundamental importância pois, os cólons com poucas evidências de inflamação foram excluídos. O tecido colônico normal demonstrou ser homogêneo, sem aumento de espessura e com coloração rósea. O tecido com colite caracterizou-se pela presença de espessamento da parede, inflamação, diarreia e em alguns casos necrose tecidual. Nos cólons com colite, foi observado que a inflamação muitas vezes não ocorreu de forma homogênea, acometendo somente algumas porções do órgão. Sendo assim, foi utilizado somente o pedaço inflamado (1,5 cm). No tecido com ampla área necrosada foi utilizado o pedaço adjacente sendo que as partes com necrose foram desprezadas. De cada colón com colite, foi obtida uma única preparação para

montagem no órgão isolado. A **Figura 1** demonstra aspectos gerais dos cólons normais e inflamados.



Figura 1. Características dos cólons para montagem no órgão isolado. (A) cólon inteiro, sem colite. (B) cólon inteiro obtido 72 horas após a indução da colite. (C) pedaço de cólon sem colite. (D, E, F, G) pedaços de cólons inflamados obtidos 72 horas após a indução da colite. (H) pedaço de cólon com colite e necrose tecidual. (I) pedaço de cólon com necrose tecidual em estágio avançado. Imagem ampliada 2 vezes.

Para a verificação da viabilidade dos cólons obtidos 72 h após a indução da colite, após a montagem em cubas para órgão isolado e decorrido o período de equilíbrio, as preparações foram contraídas com CCh (100 μ M). A resposta contrátil máxima resultante dos cólons com colite caracterizou-se por ser menor (1,3 vezes) do que a observada em cólons normais, característica essa, já identificada na literatura em órgãos submetidos à inflamação como o íleo de rato e o íleo de cão (Martinolle *et al.*, 1997; Shi e Sarna, 1999; Goldhill *et al.*, 1999).

3.3.3. Estudo do dano microscópico causado pela indução da colite experimental por TNBS

O dano microscópico dos cólons com colite experimental induzida por TNBS foi avaliado através da confecção de lâminas histológicas. Para tal, a colite foi induzida, os tecidos foram cuidadosamente limpos com solução salina (0,9%) pré-aquecida à 37 °C e colocados em uma solução de Formol a (10%) para posterior emblocamento em parafina e montagem de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. O emblocamento em anéis, corte das lâminas e coloração foram realizados externamente, por empresa terceirizada (Macro e Micro®- Florianópolis/SC). O escore microscópico foi realizado segundo a metodologia descrita por Neurath *et al.*, (1995) onde o grau do dano tecidual foi analisado, podendo alcançar valores de 0 a 4. Como demonstrado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Escala utilizada para avaliação do dano microscópico na colite induzida por TNBS.

Score	Descrição
Histológico	
0	Sem sinais de inflamação (infiltração normal no tecido)
1	Praticamente sem dano e pouca infiltração (pouquíssima diferença em relação ao normal)
2	Infiltração moderada de leucócitos
3	Grande quantidade de infiltração de leucócitos; Aumentada densidade vascular; Espessamento da parede do intestino (mais grosso do que o normal).
4	Infiltração transmural; Perda de células goblet (dano importante); Aumento da densidade vascular; Espessamento da parede do cólon (dano importante).

Metodologia descrita por Neurath *et al.*, (1995).

3.3.3.1. Caracterização do dano microscópico ocasionado após a indução da colite por TNBS em camundongos

Com o objetivo de identificar o dano microscópico causado pelo TNBS em cólons de camundongos, a colite experimental foi realizada como descrito no item (3.3.1.) e os cólons coletados em 24 h e 72 h. O animal controle recebeu somente solução salina (0,9%). Decorridos os tempos de colite, os cólons foram coletados, separados dos tecidos conectivos aderentes e cuidadosamente limpos em solução salina (0,9%) pré-aquecida a 37 °C; os cólons não foram abertos, mas sim, imediatamente colocados em solução de Formol (10%) para posterior processamento da técnica histológica.

3.3.4. Influência da colite induzida por TNBS sobre a migração celular: atividade da MPO

Para verificação indireta da migração de células polimorfonucleares em cólons com colite, as coletas dos cólons foram feitas em tempos de 6-96 horas após a indução e posteriormente realizada a metodologia para avaliação da mieloperoxidase (MPO).

A preparação dos tecidos inflamados para a avaliação da migração celular procedeu-se conforme a metodologia descrita por Passos *et al.*, (2004) com pequenas adaptações. Resumidamente, os cólons foram coletados, cortados em pedados pequenos (5 mm), homogeneizados a 5 % (peso/volume) em tampão EDTA/ NaCl/ Na₂PO₄ (pH 4,7) e centrifugados a 10.000 r.p.m., por 15 min, 4 °C. O precipitado (*pellet*) foi ressuspenso em tampão contendo brometo de hexadecil-

trimetilamônio (HTAB) 0,5 % (pH 5,4). Logo após, as amostras de cólon processadas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Depois do último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente (10.000 r.p.m., 15 min, 4 °C). O sobrenadante resultante foi utilizado no ensaio de determinação da mieloperoxidase (MPO). A atividade da MPO foi avaliada em cólons de animais controle ou com colite. Uma alíquota de 25 µl do sobrenadante obtido da preparação das amostras foi utilizada para o ensaio. A reação enzimática foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM), Na₂PO₄ (80 mM) e peróxido de hidrogênio (0,3 mM). A absorbância foi medida em 650 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) por mg de tecido.

3.4. ESTUDO FUNCIONAL, BIOQUÍMICO E MOLECULAR DAS CININAS E SEUS RECEPTORES NO CÓLON INFLAMADO

3.4.1. Análise temporal das respostas contráteis induzidas pela BK e pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Com o objetivo de verificar as possíveis alterações nas respostas contráteis para as cininas em cólons inflamados, preparações de cólons com colite por TNBS foram desafiadas com a BK ou com a des-Arg⁹-BK em grupos experimentais distintos. Primeiramente, a colite foi induzida como descrito anteriormente e em tempos diferentes (6-96 horas), os cólons foram coletados, retirados os tecidos conectivos e porções de 1,5 cm foram montadas verticalmente no órgão isolado. Após o período de equilíbrio e a verificação da viabilidade, os cólons foram desafiados com BK (1 µM). Em outro grupo experimental, curvas concentraçõ-

resposta cumulativas à BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas em cólons obtidos após 72h de inflamação tecidual.

Para avaliar a indução dos receptores B₁ na colite induzida por TNBS, cólons de camundongos foram montados em diferentes tempos (6-96 horas) após a indução da inflamação e decorrido o período de equilíbrio foram desafiados com o agonista des-Arg⁹-BK (1 µM). Nesse protocolo as viabilidades foram testadas 30 min após o termino da resposta contrátil para que o teste da viabilidade não interferisse na resposta do receptor. Seguindo o mesmo objetivo, cólons obtidos após 72h de inflamação colônica foram montados e posteriormente realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Novamente, para que não houvesse nenhuma interferência, as viabilidades foram avaliadas 30 min após o termino da resposta contrátil ao agonista B₁.

3.4.2. Estudo da densidade e afinidade dos receptores B₁ e B₂ em cólons de camundongos com ou sem colite experimental: ensaio de união específica

3.4.2.1. Preparação das membranas de cólon

Para a preparação das membranas foram utilizados 6 cólons obtidos 72 h após a administração de TNBS (com *score* de 4 a 10) e 6 cólons controle. A preparação dos tecidos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cox *et al.*, (1986) e Scherrer *et al.*, (1999) com algumas modificações. Primeiramente, os cólons foram homogeneizados em 4 ml de solução de sacarose gelada (0,25 M) e centrifugados a 4.900 rpm, por 10 min, à temperatura de 4°C. O primeiro sobrenadante obtido foi cuidadosamente retirado e guardado separadamente. O

precipitado (*pellet*) resultante foi ressuspenso em 4 ml de solução de sacarose gelada (0,25 M), homogeneizado e novamente centrifugado a 4.900 rpm, por 10 min, à temperatura de 4°C. O segundo sobrenadante resultante foi misturado com o primeiro, e foram adicionados 10 ml de tampão ((*N*-tris-hydroxy-methyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid, TES) 25 mM e fenantrolina 1 mM, pH 6,8), sendo a mistura centrifugada a 21.000 rpm por 30 min, à temperatura de 4°C. O precipitado resultante foi diluído em 2 ml de tampão de ligação (TES 25 mM, fenantrolina 1mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, bacitracina 140 µg/mL, captopril 10 µM e albumina sérica bovina 0,1%, pH 6,8). Os níveis protéicos foram determinados de acordo com o método de Bradford (1976) e a concentração utilizada foi de 0,8 mg/ml. Depois de processadas, as membranas foram utilizadas apenas uma vez.

3.4.2.2. Ensaio de união específica (*binding* de saturação)

O experimento de união específica para os receptores B₂ utilizou: 125 µl de membranas (previamente processadas como descrito no item anterior) as quais foram incubadas com tampão de ligação (composição descrita acima), à 25°C, com concentrações crescentes de [*prolyl*^{2,3}-3,4(*n*)-³H]-BK ([³H]-BK, com atividade específica de 94,0 Ci/mmol) (0,03-10 nM). Para avaliar a ligação não específica foi utilizada BK não marcada, adicionada em tubos separados a uma concentração final de 1 µM.

O protocolo de união específica para os receptores B₁ foi semelhante ao utilizado anteriormente para os receptores B₂ seguindo-se: 125 µl de membranas as quais foram incubadas com tampão de ligação, à 25°C, com concentrações crescentes de [³H]-des-Arg¹⁰-*kallidin* ([³H]-des-Arg¹⁰-KD, com atividade específica de

82,0 Ci/mmol) (0,03-10 nM). Para avaliar a ligação não específica, foi utilizado o antagonista des-Arg⁹-Leu⁸-BK não marcado e adicionado em tubos separados a uma concentração final de 1 µM.

Em ambos os protocolos, após 90 min de incubação as membranas foram transferidas para filtros previamente umedecidos com *polyethyleneimine* 0,1% e então lavadas sobre uma superfície individual com vácuo, por oito vezes, com 1 ml de Tris-HCl gelado (50 mM, pH 7,4).

Para avaliar a quantidade de peptídeos marcados ligados, os filtros foram imersos em líquido de cintilação e a radioatividade foi avaliada com uso de um cintilador Packard[®]. A união específica foi definida pela diferença entre os valores obtidos na leitura do total menos a leitura inespecífica. Dessa forma, foi possível o cálculo da união específica, saturação máxima $B_{m\acute{a}x}$ e a constante de dissociação (K_d). O número de experimentos realizados para cada radioligante variou entre 5 e 8.

3.4.3. Quantificação do RNA mensageiro para os receptores B₁ e B₂ das cininas em cólons de camundongos com colite experimental

Com o objetivo de verificar o efeito da colite sobre a indução dos receptores B₁ e B₂ para as cininas, foram quantificados os níveis de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para estes receptores em diferentes tempos após a indução da colite, através da técnica da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês *reverse transcriptase - polymerase chain reaction*), baseando-se na metodologia descrita por Trevisani *et al.*, (1999) e Campos *et al.*, (2002) com algumas adaptações.

3.4.3.1. Extração do RNA total

Cólons de animais controle ou com colite experimental de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, foram coletados em capela de fluxo laminar em condições livres de RNase e armazenados em tubos siliconizados (do tipo *Eppendorf*) contendo 1,5 ml de TRIzol (Invitrogen, Scotland, UK). As amostras de cólon foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -70°C. Para a extração do RNA total, as amostras foram descongeladas e transferidas individualmente para tubos de plástico (do tipo *Falcon*) onde foram homogeneizadas. Nesse procedimento, foram tomados cuidados específicos como a completa higienização do homogeneizador com NaOH 0,5 M e água ultra pura em cada troca de tecido. A extração foi realizada conforme a determinação do fabricante e teve início com a transferência individual de cada homogenato para tubos siliconizados (do tipo *Eppendorf*), com posterior adição de 200 µl de clorofórmio. Em seguida os tecidos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa resultante dessa centrifugação foi retirada e acondicionada em outro tubos siliconizados (do tipo *Eppendorf*). Para o início da precipitação do RNA total, ao sobrenadante foi acrescentado 500 µl de isopropanolol. Essa nova mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante resultante foi removido por inversão e ao precipitado (*pellet*) foi adicionado 1 ml de etanol 75 % gelado. Essa mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min a 4°C. Por inversão, o conteúdo de etanol foi retirado e o precipitado que corresponde ao RNA total foi dissolvido em 20 µl de água ultra pura. Desse modo, o RNA resultante da extração pode então ser quantificado com o uso de espectrofotômetro HITACHI®, através dos valores obtidos pelas absorvâncias em 260 nm e 280 nm e pela razão das absorvâncias 260/280

nm. Razões acima de 1,7 foram consideradas satisfatórias para a realização dos experimentos. O RNA total foi alíquotado e estocado a - 70°C até o momento do uso.

3.4.3.2. Confeção do c-DNA (Reação de Transcrição Reversa)

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV (200 U, Invitrogen, Scotland, UK). Essa reação foi realizada utilizando-se: 5 µg de RNA; 0,5 ng de oligo dT; 0,5 mM de dNTP mix; 40 U de RNase OUT (Invitrogen, Scotland, UK); 0,01 mM de DTT mais tampão de reação da M-MLV para um volume final de reação de 20 µl. O c-DNA foi preparado de acordo com as especificações do fabricante da enzima transcriptase reversa. Os c-DNAs obtidos foram armazenados a 4°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR dos c-DNAs obtidos)

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando-se a enzima *Taq*-Polimerase (Luwig, Porto Alegre, Brazil), seguindo-se as especificações do fabricante. Para cada reação foram utilizados: 2,5 µl de tampão; 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µl de dNTP (mistura 10 mM); 19,5 µl de água ultra pura; 0,5 µl de *primer sense* (10 µM); 0,5 µl de *primer anti-sense* (10 µM); 0,25 µl da enzima *Taq*-Polimerase (5 U) e 0,5 µl do c-DNA específico. Perfazendo-se um volume total de 25 µl cada reação. Os *primers* utilizados foram: para o receptor B₁ o *anti-sense* 5'-CGCAGGTTGTGCAGGCCGAT-3' e o *sense* 5'-GTAGAGTTCCGGGATTAC-3'; para o receptor B₂ o *anti-sense* 5'-ATCCTCACTCCTCTTTGTC-3' e o *sense* 5'-

GGTCCTGAACACCAACATGG-3' e para a β -actina o *anti-sense* 5'-CGTCTCCGGAGTCCATCACA-3' e o *sense* 5'-TCCTTCGTTGCCGGTCCACA-3'. Para a realização da PCR, foi utilizado um termociclador de DNA (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg, Germany). As condições para a PCR foram: 5 min a 95°C seguidos por ciclos com repetições seqüenciais de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e 1 min e meio a 72°C. Durante a padronização experimental foi variado o número de ciclos da PCR entre 27 e 39. Desse modo, foi possível a identificação do número de ciclos ideal para a visualização e quantificação de cada banda. Para o receptor B₁ e para a β -actina foram utilizados 31 ciclos, para o receptor B₂, 35 ciclos. Os produtos da PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,8 % contendo GoldView™. O tamanho e a localização das bandas foram confirmados pelo uso de um DNA Ladder (Invitrogen, Scotland, UK) com 50 pb. As bandas que identificaram os receptores B₁, B₂ e a β -actina possuíam 646, 624 e 508 pares de base (pb), respectivamente. A análise semi-quantitativa foi realizada pela medida da densidade óptica das bandas correspondentes ao receptor B₁ ou ao receptor B₂, dividida pelo valor da densidade óptica obtida para a β -actina. As densidades ópticas foram obtidas com o programa Scion Image®.

3.4.4. Estudo da colite experimental em animais com deleção gênica para os receptores B₁ e B₂

Com o intuito de avaliar a contribuição dos receptores B₁ e B₂ na gênese da colite foram utilizados animais com deleção gênica para os receptores (B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-}). Como linhagem controle, utilizou-se animais C57/BL6 (n=5 para animais com deleção gênica e controles). A colite foi induzida como descrito no item (3.3.1) e

após 72 horas de inflamação colônica induzida por TNBS foi realizado o score macroscópico. A seguir, os cólons foram congelados à -70°C para posterior avaliação da migração celular com a da técnica da MPO descrita no item (3.3.4.).

3.5. POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DO RECEPTOR B₁ NA COLITE POR TNBS

Os experimentos descritos nessa seção seguiram o protocolo abaixo:

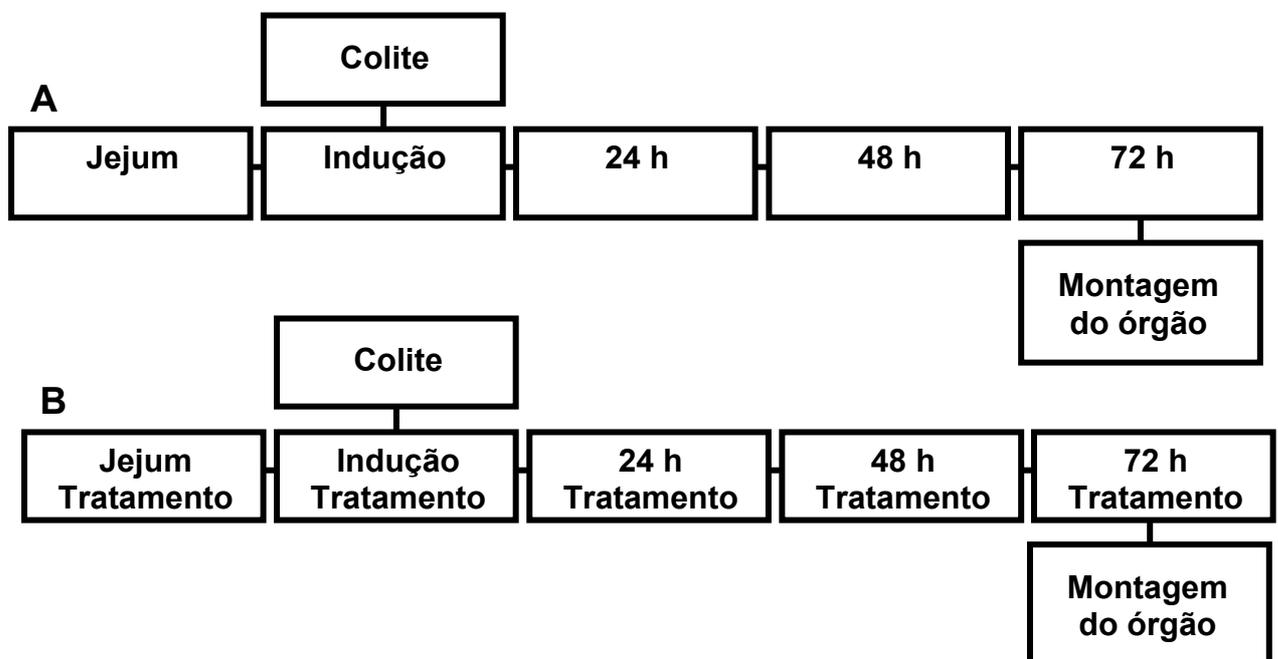


Figura 2. Protocolo de indução da colite por TNBS em camundongos juntamente com os tratamentos *in vivo*. Em (A) protocolo de indução da colite, do jejum até 72 h de inflamação colônica induzida por TNBS para posterior montagem dos cólons no órgão isolado; (B) protocolo de indução da colite desde o jejum onde foram iniciados os tratamentos até 72 h de inflamação induzida por TNBS, posteriormente os cólons foram montados no órgão isolado.

3.5.1. Papel da síntese protéica na indução do receptor B₁ e nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Na tentativa de relacionar o processo de síntese protéica com a indução dos receptores B₁ na colite por TNBS, os inibidores foram administrados *in vivo* para posterior montagem e desafio *in vitro*. Grupos distintos de animais, ambos com indução de colite, receberam ou não tratamento desde o jejum, com cicloheximida (2,5 mg/kg, 2 vezes ao dia, i.p.) ou com dexametasona (1 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) (Rejdak *et al.*, 2001). Setenta e duas horas após a indução da inflamação no cólon, os tecidos foram coletados, montados no órgão isolado e desafiados na realização de curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Com o intuito de verificar o efeito dos tratamentos sobre a progressão da colite, foi também realizada análise histológica nos tecidos dos animais previamente tratados.

Em outro grupo experimental, para avaliar o papel da síntese protéica nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, preparações de cólons obtidas 72 horas após a indução da colite foram montadas e incubadas com a cicloheximida (inibidor de síntese protéica e de transdução, 70 µM), ou com a dexametasona (inibidor de síntese protéica e da transcrição gênica, 100 µM) (Campos e Calixto, 1994). Ambos inibidores foram incubados por 20 min e decorrido esse período foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM).

3.5.2. Possível participação da via fosfatidil inositol-3-quinase γ (PI3K γ) na indução do receptor B₁ em cólons de camundongos com colite

A fim de verificar se a via da PI3K γ poderia estar envolvida no processo de indução do receptor B₁ no cólon, os animais foram tratados com o inibidor AS 605240 (inibidor seletivo da PI3K γ). Para tanto, os animais foram divididos em diferentes grupos, nos quais procedeu-se o protocolo de indução de colite descrito no item (3.3.1) sendo que o tratamento com o AS 605240 (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.) teve início no jejum e se estendeu até 72 h (Camps *et al.*, 2005). Após 72 h da indução da inflamação colônica as preparações de cólons foram montadas no órgão isolado e foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Tecidos colônicos obtidos a partir dos animais de ambos os grupos (tratados e não tratados) foram submetidos à análise histológica.

3.5.3. Participação do NF- κ B na indução do receptor B₁ em cólons de camundongos submetidos à colite experimental

Com o objetivo de avaliar a participação do fator de transcrição NF- κ B na regulação da indução do receptor B₁ em cólons de camundongos com colite experimental, realizou-se o protocolo de indução da colite por TNBS em grupos distintos tratados ou não desde o jejum com PDTC (inibidor do NF- κ B, 30 mg/kg, 1 vez ao dia, i.p.) (Cuzzocrea *et al.*, 2002). Após a indução da colite e o concomitante tratamento, os tecidos foram montados em câmaras para órgão isolado e realizaram-se curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Com o intuito de determinar um possível efeito do tratamento com o PDTC sobre o dano

tecidual, cólons de camundongos que passaram pelo mesmo protocolo experimental foram submetidos à análise histológica.

3.5.4. Investigação da participação da citocina TNF α sobre a indução do receptor B₁ em cólon de camundongos na colite experimental por TNBS

Nesta série de experimentos foram utilizadas ferramentas farmacológicas e genéticas para investigar a participação da citocina TNF α na indução do receptor B₁ *in vivo*. Sendo assim, diferentes grupos de animais separados em tratados ou não tratados foram submetidos ao protocolo experimental de indução de colite. Os distintos grupos tratados colite, receberam desde o jejum talidomida (inibidor da citocina TNF α , 50 mg/kg, 1 vez ao dia, v.o.) (Rodrigues *et al.*, 2007) ou o infliximab (anticorpo quimérico anti-TNF α , 2 mg/kg, 1 vez ao dia, s.c.) (Steed *et al.*, 2003). Decorridas 72 h após a indução da colite os tecidos colônicos foram isolados e montados como descrito anteriormente. A seguir, foi avaliada a resposta contrátil para a des-Arg⁹-BK na realização de curvas concentração resposta cumulativas (0,1-10.000 nM). Para ambos os grupos experimentais, a talidomida ou o infliximab realizaram-se também as análises histológicas dos cólons.

Seguindo o mesmo objetivo, camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α (TNF p55^{-/-}) e seus respectivos controles da linhagem C57/BL6 foram submetidos ao protocolo experimental de indução de colite. Setenta e duas horas após a indução, procederam-se em ambos os grupos a avaliação da resposta contrátil frente à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM).

3.5.5. Estudo da participação da iNOS na indução do receptor B₁ em cólons de camundongos na colite experimental induzida por TNBS

Com o objetivo de avaliar o envolvimento da iNOS na indução do receptor B₁ na colite induzida por TNBS, um grupo de animais recebeu desde o jejum o inibidor 1400 W (inibidor seletivo iNOS, 10 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) (Girard *et al.*, 2005). Seguindo-se o cronograma de tratamentos, após 72 h de colite os cólons foram montados em câmaras para órgão isolado e realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Para verificar um possível efeito protetor tecidual decorrente do tratamento com o inibidor 1400 W, após a realização do tratamento, os cólons foram submetidos à análise histológica.

A fim de confirmar a participação da enzima iNOS no processo de indução do receptor B₁, o protocolo experimental de indução de colite foi realizado em camundongos com deleção gênica para iNOS (iNOS^{-/-}) e seus respectivos controles da linhagem C57/BL6. Os cólons provenientes dos animais iNOS^{-/-} e seus controles C57/BL6 foram coletados 72 h após a indução da colite, montados e então curvas concentração-resposta cumulativa para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas.

3.6. POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA CONTRÁTIL DESENCADEADA PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR B₁ EM CÓLONS DE CAMUNDONGOS COM COLITE

3.6.1. Participação dos receptores B₁ e B₂ na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Com o intuito de investigar o perfil farmacológico dos receptores B₁ em cólons com colite, após inflamação colônica de 72 horas, os tecidos foram montados e em seguida, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK na ausência ou presença do antagonista seletivo para o receptor B₁ R 715 (1-10 nM). Em outra série de experimentos, com o objetivo de avaliar uma possível participação dos receptores B₂ na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, preparações de cólons após 72 horas de colite foram pré-incubadas com o antagonista FR 173657 (100 nM). A seguir, realizaram-se curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) (El Sayah *et al.*, 2006). Ambos os antagonistas foram pré-incubados nas preparações por 10 min antes do desafio à des-Arg⁹-BK.

3.6.2. Influência do cálcio extracelular e de canais de cálcio do tipo L nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Após indução da colite por TNBS, os cólons foram coletados em 72 horas e montados em cubas para órgão isolado; em seguida obteve-se uma curva

concentração-resposta cumulativa para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM), curva denominada controle em solução de Krebs-Henseleit. Com o objetivo de avaliar a contribuição do cálcio externo na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, as preparações passaram a ser banhadas com solução de Krebs-Henseleit modificada sem cálcio, contendo o quelante de cálcio etilenoglicol-bis (β -amino-etil éster) (EGTA 1 mM). Os cólons permaneceram nesta solução nutritiva modificada por 20 min sendo a mesma renovada a cada 5 min. Terminado esse período, realizou-se uma curva concentração-resposta cumulativa à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Depois de registradas as respostas contráteis, as preparações foram novamente banhadas em solução Krebs-Henseleit contendo cálcio por cerca de 40 min, e uma nova curva concentração-resposta à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foi realizada (Campos e Calixto, 1994).

Em outro grupo experimental em cólons de camundongos obtidos após 72 horas de inflamação colônica induzida por TNBS, avaliou-se a participação de canais de cálcio do tipo L na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK. Desse modo, curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas na ausência e na presença de nifedipina (antagonista de canais de cálcio do tipo L, 1 μ M) (El Sayah e Calixto, 2003b). O antagonista foi incubado nas preparações por 20 min.

3.6.3. Possível envolvimento da liberação de ácido araquidônico, das enzimas COX, LOX e seus subprodutos eicosanóides nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Com objetivo de verificar o envolvimento de fosfolipases de membrana, responsáveis pela liberação do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, cólons de camundongos obtidos após 72 horas de inflamação colônica induzida por TNBS foram incubados com o PACOCF₃ (inibidor da fosfolipase A₂ (PLA₂), 10 µM) ou com o U73122 (inibidor da fosfolipase C (PLC), 300 nM). Decorrido o período de pré-incubação (20 min), foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). A seguir, utilizando-se novos grupos experimentais com inflamação colônica de 72 horas, as preparações foram incubadas com os seguintes inibidores: Indometacina (inibidor não seletivo para COX-1 e 2, 1 µM), DFU (inibidor seletivo da COX-2, 1 µM), SC 560 (inibidor preferencial da COX-1, 1 µM) e MK 571 (antagonista seletivo para o receptor de leucotrieno D₄, 100 nM) (Cabrini e Calixto, 1997; El Sayah e Calixto, 2003a; Schlemper *et al.*, 2005). Em grupos experimentais distintos, os inibidores foram incubados por 20 min, após esse período, realizaram-se então, as curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM).

3.6.4. Participação da via do óxido nítrico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

Para avaliar o possível envolvimento do NO nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em tecidos colônicos obtidos após 72 horas de inflamação induzida por TNBS, os mesmos, foram montados em cubas para órgão isolado e incubados por 20 min com aminoguanidina (inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), 10 µM) (Schlemper *et al.*, 2005), L-NIO (inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), 10 µM) (Rees *et al.*, 1990) e 1400 W (inibidor da iNOS, 10 µM) (Mulè *et al.*, 2006). Após o término da incubação com os inibidores (20 min), foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM).

3.6.5. Influência das proteínas quinases nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite

No intuito de investigar alguns dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite, foi verificada a participação de algumas proteínas quinases (PKs). Para tanto, cólons de camundongos após 72 horas de inflamação colônica induzida por TNBS foram montados em cubas para órgão isolado e a seguir incubados com os seguintes inibidores: KT5720 (inibidor da proteína quinase A (PKA), 100 nM), GF109203X (inibidor da proteína quinase C (PKC), 1 µM), AS605240 (inibidor seletivo da *phosphoinositide* 3-quinase subunidade gama (PI3K γ), 10 µM) e PD98059 (inibidor da MEK, 10 µM) (Medeiros *et al.*, 2004; Schlemper *et al.*, 2005; Camps *et al.*, 2005).

Ao término do período de incubação (20 min), curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas.

3.7. DROGAS E REAGENTES

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: ω -conotoxin GVIA (Alamone Labs, Jerusalem, Israel); [*prolyl*^{2,3}-3,4(n)-³H] BK ([³H]-BK) (Amersham Biosciences, UK); Hoe 140 (D-Arg⁰-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (icatibant) (Aventis Pharma Deutschland, Frankfurt Main, Germany); capsazepina (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA); ((*E*)-3-(6-acetamindo-3-pyridyl)-*N* [N-2-4-dichloro-3-[(2-methyl-8-quinolinyl)oxy-methyl]phenyl]-*N*-methylamino-carbonyl-ethyl]crylamide) (FR 173657) (gentilmente doado pela Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan); agarose, TRIzol (Invitrogen, Scotland, UK); (2*R*-*trans*)-4-[1-[3,5-bis(trifluoromethyl)benzoyl]-2-(phenylmethyl)-4-piperidiny]-*N*-(2,6-dimethylphenyl)-1-acetamide(*S*)-hydroxybutanedioate (R116301) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium); benzodiazepínico-1 (BZ-1), 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) (fenil2(5H) furanona (DFU), (3-(3-(2-(7-chloro-2-quinolinyl) ethenyl) phenyl ((3-dimethyl amino-3oxo-propyl)thio) methyl)) propanoic acid (MK-571) 4-(4'-methylsulphonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone (Rofecoxibe) sulfato de atropina, (Merck- Kirkland, Quebec, Canada and Darmstadt, Germany); Infliximab (Remicade®); [³H]-des-Arg¹⁰-Kallidin (PerkinElmer Life and Analytical Science, Paris, França); PD 98059 (Research Biochemical International, RBI, MA, EUA); (S)-*N*-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl)propyl)-4-phenylpiperidin-4-yl)-*N*-methylacetamide(SR 142801), (S)-*N*-methyl-*N*-[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide (SR 48968), [(2*R*)-2-[(3*R*)-3-(1,3-

Benzodioxol-5-yl)-3-[[*(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl*amino}propanoil)amino]-3-(4-[[*2R,6S*)-2,6-dimethylpiperidiny]methyl}phenyl)-*N-isopropyl-N-ethylpropanamide hydrochloride*] (SSR240612) (gentilmente doado pela Sanofi Recherche, Montpellier, France); albumina sérica bovina (BSA), bacitracina, BK, fragmento 8-37 relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), captopril, carbacol (CCh), cicloheximida, des-Arg⁹-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, dexametasona, *dithiothreitol* (DTT), etilenoglicol-bis (β -amino-etil éster) (EGTA), Hyp³-BK, solução de formaldeído, indometacina, Lys-BK, Met-Lys-BK, nicardipina, fenantrolina, GF109203X, hexadecil-trimetilamônio (HTAB), KT 5720, *polyethylenimine*, *pyrrolidinedithiocarbamate* (PDTC), R715, 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1*H*-pyrazole (SC 560), (N-tris(hydroxy-methyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES), tetrametilbenzidina (TMB) tetrodotoxina (TTX), 2,2,2-tribromoethanol, 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS), Trizma® base, Tyr⁸-BK, (todos provenientes da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); Aminoguanidina *hydrochloride*, EDTA, N⁵-(1-Iminoethyl)-*L*-ornithine *dihydrochloride* (L-NIO), N-[[3-(Aminomethyl)phenyl]methyl]-ethanimidamide *dihydrochloride* (1400W), 1,1,1-trifluoro-2-heptadecanona (PACOCF₃), 4'-chloro-3-methoxycinnamanilide (SB 366791), Talidomida, U73122, (Tocris Bioscience, Ellis-Ville, USA). Todos os reagentes e sais utilizados possuíam pureza analítica de origem Merck ou Vetec.

O composto AS605240 foi sintetizado pelo químico Paulo Leal, da Universidade Federal de Santa Catarina, segundo a patente WO 2004/007491 A1.

As soluções estoque para os peptídeos foram preparadas em PBS (1-10 mM), em tubos siliconizados, mantidas a -18°C e diluídas nas concentrações desejadas no dia dos experimentos. Em algumas diluições, a concentração final de etanol ou DMSO não excedeu 0,05%. Em todos os grupos experimentais, foram realizados

experimentos controle na presença do veículo utilizado para a diluição da droga. Os veículos utilizados não tiveram ação farmacológica sobre as respostas contráteis.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto para as CE_{50} (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança abrangendo 95%.

Na maior parte das vezes, a análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste "t" de *Student*, não pareado. Em alguns casos fez-se necessária a utilização da análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keul's* (SNK). Os valores de P menores que 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons de camundongos

Com o objetivo de avaliar o efeito das cininas em preparações de cólons isolados de camundongos foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para diferentes agonistas cininérgicos (**Figura 3**). Como demonstrado na **figura 3 A**, o agonista seletivo do receptor B₂ para as cininas, bradicinina (BK; 0,1-10.000 nM), foi capaz de promover resposta contrátil de maneira concentração-dependente 90 min após a montagem das preparações. A resposta máxima (R_{máx}) produzida pela BK foi 61,4 ± 1,3 % em relação à contração induzida pelo carbacol (CCh), enquanto que a concentração efetiva 50 % (CE₅₀) para esse peptídeo foi 102,9 (62,9 - 168,3) nM. Por outro lado, a adição de concentrações crescentes do agonista seletivo do receptor B₁ para as cininas, des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM), 90 min após a montagem dos cólons de camundongos resultou em R_{máx} de apenas 5,2 ± 1,5 % em relação a resposta contrátil produzida pelo CCh (**Figura 3 A**). A resposta contrátil induzida pela BK foi significativamente maior do que àquela produzida pela des-Arg⁹-BK, sendo a relação R_{máx} (BK/des-Arg⁹-BK) igual a 11,8.

Inúmeros estudos reportam a propriedade de dessensibilização dos receptores B₂ para as cininas em diferentes tipos celulares depois de repetidas estimulações pela BK (Praddaude *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Bartus *et al.*, 1996; Mathis *et al.*, 1996). Para avaliar se tal característica ocorre no cólon de camundongos foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK após diferentes intervalos de tempo em uma mesma preparação. Os dados da

figura 3 B demonstram que curvas concentração-resposta cumulativas consecutivas construídas em 90, 180 e 270 min após a montagem não diferem no padrão da resposta contrátil à BK, sugerindo ausência de dessensibilização do receptor B₂ no cólon de camundongos nesses tempos e nessas condições experimentais.

No intuito de determinar a ordem das respostas máximas para diferentes agonistas cininérgicos em preparações de cólons isolados de camundongos foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK, Lys-BK, Hyp³-BK, Tyr⁸-BK, Met-Lys-BK e des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) 90 min após a montagem dos tecidos. Como demonstrado na **figura 3 C** e na **tabela 4**, os agonistas analisados apresentaram a seguintes respostas máximas no cólon isolado de camundongos: BK > Lys-BK > Hyp³-BK > Tyr⁸-BK > Met-Lys-BK > des-Arg⁹-BK.

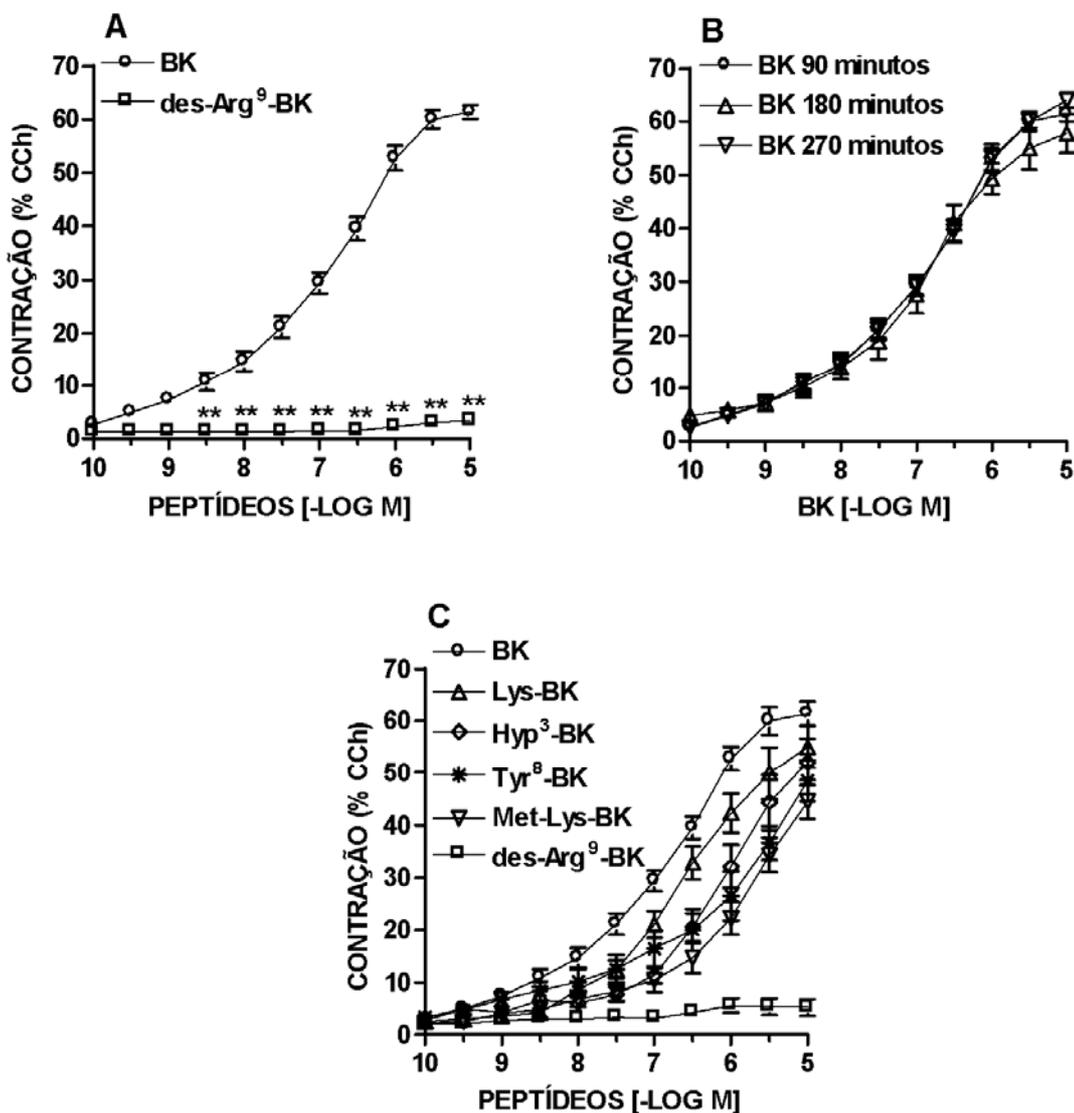


Figura 3. Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas em cólons isolados de camundongos. (A) Resposta contrátil induzida pela BK (0,1-10.000 nM) ou pela des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) obtida 90 min após a montagem dos tecidos. (B) Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) realizadas nos mesmos tecidos 90, 180 e 270 min após a montagem dos tecidos. (C) Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK, Lys-BK, Hyp³-BK, Tyr⁸-BK, Met-Lys-BK e des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) obtidas 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). **P<0,01 comparado ao grupo BK (teste "t" de Student não pareado).

Tabela 4. Ordem de potências relativas para diferentes agonistas cininérgicos em preparações de cólons isolados de camundongos

Agonistas cininérgicos (0,1-10.000 nM)	Resposta máxima (% CCh)	CE₅₀ (limite de confiança de 95%, nM)
BK	61,4 ± 1,3	102,9 (62,9-168,3)
Lys-BK	55,0 ± 4,1	448,9 (267,3-753,3)
Hyp³-BK	52,0 ± 4,5	826,0 (514,0-1,327.3)
Tyr⁸-BK	48,4 ± 3,9	304,0 (112,9-839,4)
Met-Lys-BK	44,4 ± 3,9	587,6 (368,9-1,177.6)
Des-Arg⁹-BK	3,4 ± 0,3	-

Cada grupo representa a média de seis experimentos independentes.

A fim de caracterizar os subtipos de receptores envolvidos na contração induzida pela BK no cólon de camundongos, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) 90 min após a montagem das preparações na ausência ou na presença do antagonista seletivo para o receptor B₂, Hoe 140 (3-30 nM) ou FR173657 (10-100 nM), ou na presença do antagonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μM). Os resultados da **figura 4** demonstram que tanto o Hoe140 (**Figura 4 A**) quanto o FR173657 (**Figura 4 B**) foram capazes de reduzir de maneira concentração-dependente a resposta contrátil induzida pela BK. Além disso, foi possível verificar tanto para o Hoe 140 como para o FR173657 o antagonismo competitivo com características de irreversibilidade (insuperável) dentro do intervalo de tempo para a obtenção das curvas concentração-resposta cumulativas. Contudo, a administração do antagonista seletivo do receptor B₁ a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK não foi capaz de alterar significativamente a resposta contrátil induzida pela BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos (**Figura 4 C**).

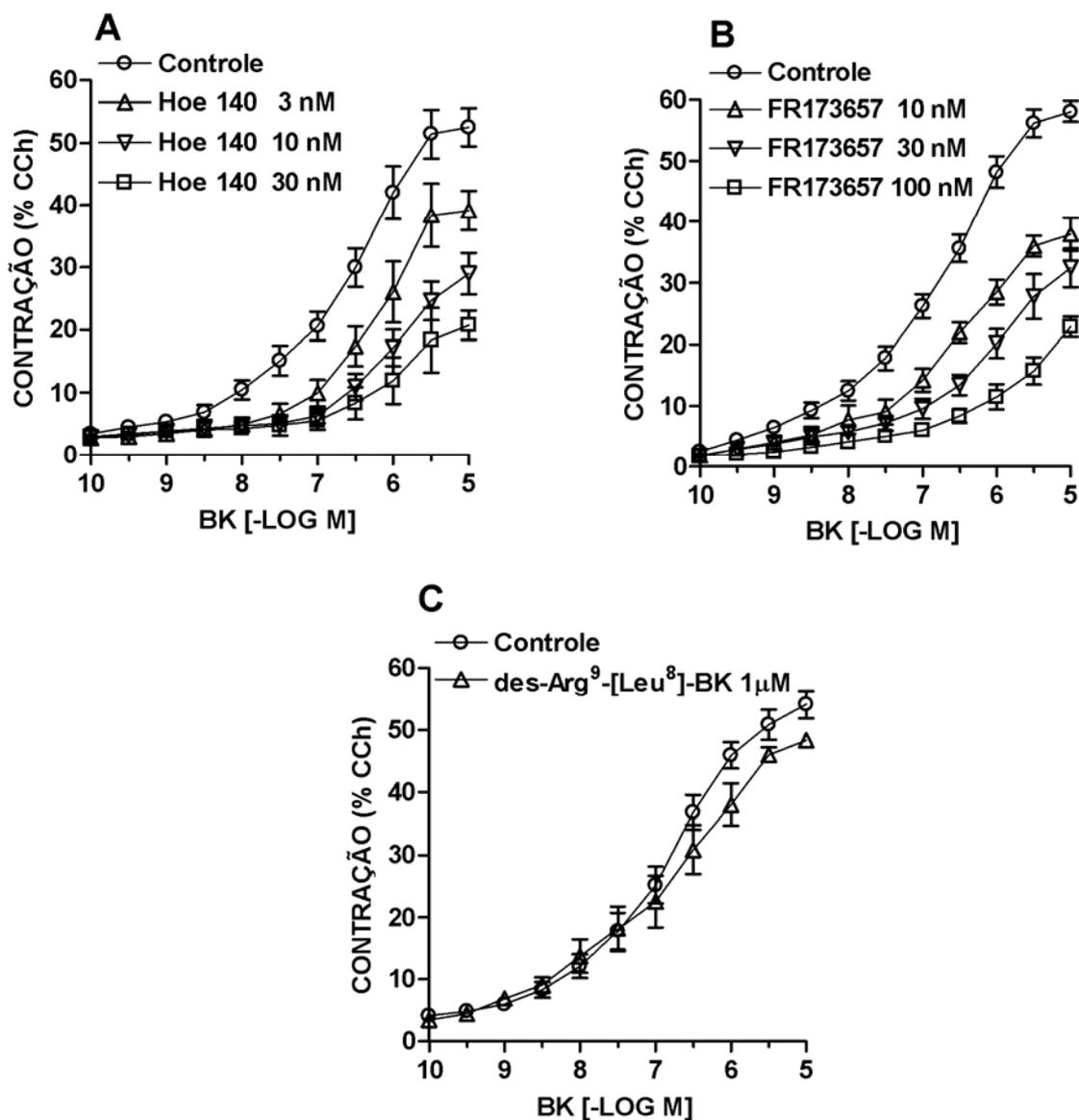


Figura 4. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos na ausência ou na presença de (A) Hoe140 (3-30 nM), (B) FR173657 (10-100 nM) ou (C) des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μM) 90 min após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6).

4.2. Participação do cálcio extracelular e de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos

Com o objetivo de avaliar a participação do cálcio externo na resposta contrátil induzida pela BK, após a obtenção de uma curva concentração-resposta cumulativa para a BK (0,1-10.000 nM), em solução de Krebs-Henseleit contendo cálcio, as preparações passaram a ser banhadas com solução de Krebs-Henseleit modificada, ausente de cálcio, contendo o quelante de cálcio etilenoglicol-bis (β -amino-etil éster) (EGTA 1 mM). Os cólons permaneceram nesta nova solução nutritiva por 20 min, sendo a mesma renovada a cada 5 min. Nessas condições, a contração induzida pela BK em cólons de camundongos foi completamente abolida (**Figura 5 A**). Entretanto, quando as preparações foram reequilibradas em solução Krebs-Henseleit contendo cálcio a resposta contrátil induzida pela BK foi novamente restabelecida (dados não mostrados).

Além disso, foi investigada a possível participação de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK foram obtidas 90 min após a montagem das preparações na ausência ou presença do bloqueador de canais de cálcio do tipo L, a nicardipina (1 μ M) ou do bloqueador seletivo de canais de cálcio do tipo N, a ω -conotoxina GVIA (0,1 μ M). Como demonstrado na **figura 5**, tanto a nicardipina (**Figura 5 B**) quanto à ω -conotoxina GVIA (**Figura 5 C**) reduziram significativamente a resposta contrátil induzida pela BK. A redução na $R_{m\acute{a}x}$ da BK em cólons isolados de camundongos pela nicardipina e ω -conotoxina GVIA foi de $34,87 \pm 6,53$ e $23,50 \pm 1,95$ %, respectivamente.

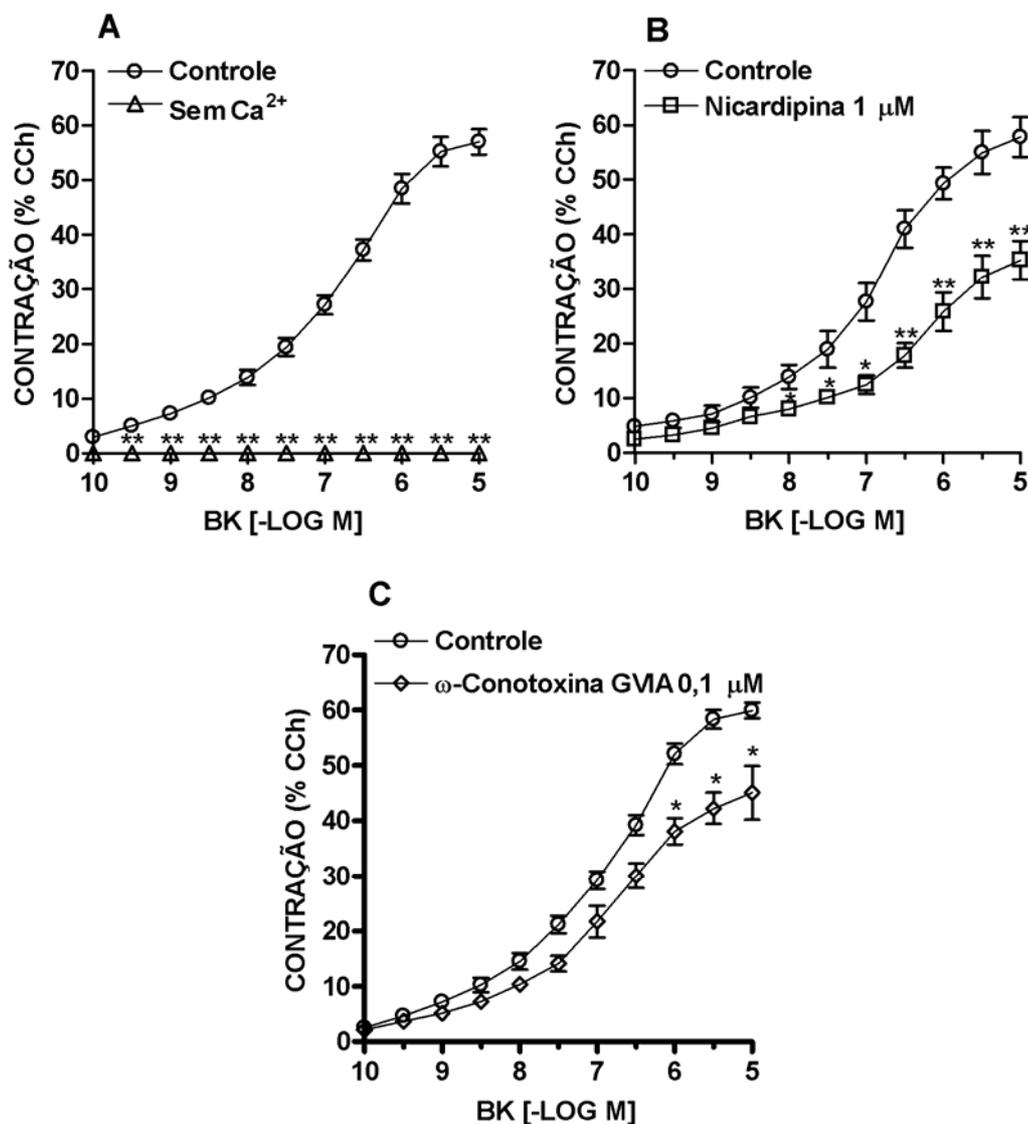


Figura 5. Papel do cálcio extracelular e de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. (A) Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos realizadas em solução de Krebs-Henseleit com cálcio ou sem cálcio mais EGTA (1 mM). Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos obtidas na ausência ou presença de (B) nicardipina (1 μM) ou (C) ω-conotoxina GVIA (0,1 μM) 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.3. Estudo do envolvimento do sistema colinérgico e de canais de sódio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos

Com o intuito de estudar o envolvimento da transmissão colinérgica e de canais de sódio nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons isolados de camundongos, curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas na ausência ou na presença do agente anticolinérgico atropina (1 μ M) ou do bloqueador de canal de sódio tetrodotoxina (TTX, 1 μ M), 90 min após a montagem das preparações. Os resultados da **figura 6 A** demonstram que a atropina (1 μ M) foi capaz de reduzir significativamente a contração induzida pela BK no cólon de camundongo, causando inibição da $R_{m\acute{a}x}$ para a BK de $57,28 \pm 4,83$ %. Além disso, a incubação de preparações de cólons isolados de camundongos com TTX (1 μ M) reduziu significativamente a $R_{m\acute{a}x}$ induzida pela BK em $39,58 \pm 4,52$ % (**Figura 6 B**).

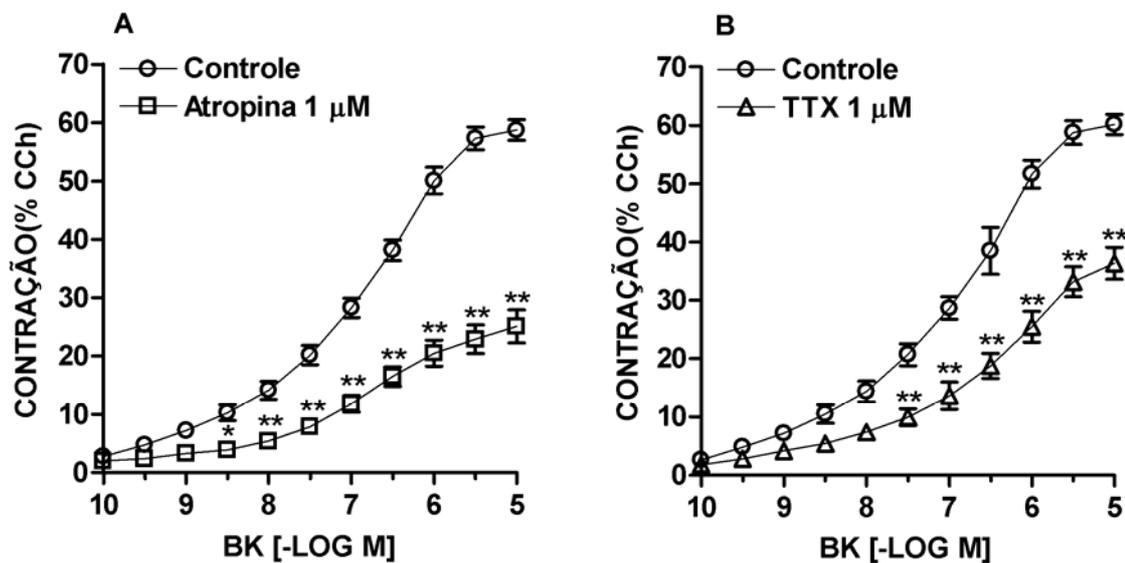


Figura 6. Papel do sistema colinérgico e de canais de sódio na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas para BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos realizadas na ausência ou presença de (A) atropina (1 μM) ou (B) tetrodotoxina (TTX; 1 μM) 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.4. Contribuição dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Com o objetivo de verificar a possível participação dos derivados da via do ácido araquidônico na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos, curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) foram obtidas 90 min após a montagem das preparações, na ausência ou presença do inibidor não seletivo das COXs indometacina (1 μ M), do inibidor seletivo da COX-2 rofecoxibe (1 μ M), do inibidor preferencial da COX-1 SC560 (1 μ M) ou do antagonista do receptor de leucotrieno D₄ MK571 (100 nM). Os dados da **figura 7** indicam que os inibidores indometacina (**Figura 7 A**), rofecoxibe (**Figura 7 B**) ou o SC560 (**Figura 7 C**), foram capazes de reduzir significativamente ($41,90 \pm 4,00$; $37,34 \pm 5,70$ e $23,25 \pm 5,10$ %, respectivamente) a resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos. Além disso, a incubação das preparações com o MK571 inibiu significativamente a resposta contrátil induzida pela BK, reduzindo a $R_{m\acute{a}x}$ para a BK em $16,36 \pm 2,04$ % (**Figura 7 D**).

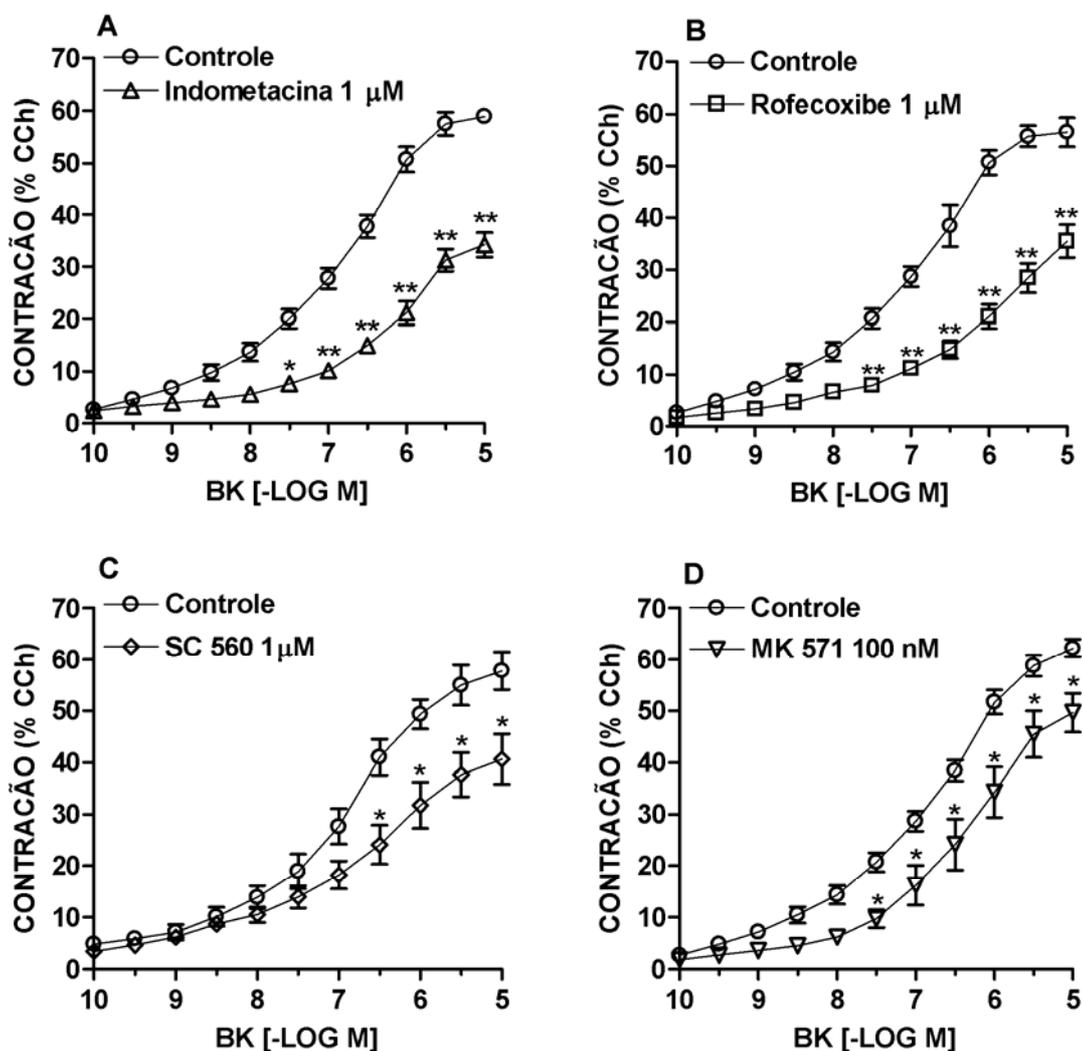


Figura 7. Papel dos derivados da via do ácido araquidônico sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos obtidas na ausência ou presença de (A) indometacina (1 μ M), (B) rofecoxibe (1 μ M), (C) SC560 (1 μ M) ou (D) MK571 (100 nM) 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste "t" de Student não pareado).

4.5. Participação dos neuropeptídeos e do CGRP nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos

Na continuidade dos estudos, foi avaliada a participação dos neuropeptídeos, incluindo a substância P, a neurocinina A, a neurocinina B e o CGRP sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Para tanto, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) 90 min após a montagem das preparações, na ausência ou presença do inibidor seletivo do receptor NK₁ R116301 (100 nM), NK₂ SR48968 (100 nM) ou NK₃ SR142801 (100 nM). Os resultados evidenciados na **figura 8** mostram que somente o antagonista NK₁ R116301 (**Figura 8 A**) e o antagonista NK₃ SR142801 (**Figura 8 C**) foram capazes de reduzir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos (redução da R_{máx} de 34,62 ± 7,36 % e 18,70 ± 1,29 %, respectivamente). No entanto, o antagonista NK₂ SR48968 (**Figura 8 B**) não alterou a contração induzida pela BK em preparações de cólons de camundongos.

Além disso, em outro grupo experimental foi avaliada a possível participação do CGRP na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos. Para tal, as preparações foram incubadas com o antagonista do receptor para o CGRP, o fragmento CGRP₍₈₋₃₇₎ (1 μM). O resultado da **figura 8 D** demonstra que o fragmento CGRP₍₈₋₃₇₎ reduziu significativamente a R_{máx} para a BK em 49,30 ± 7,52 %.

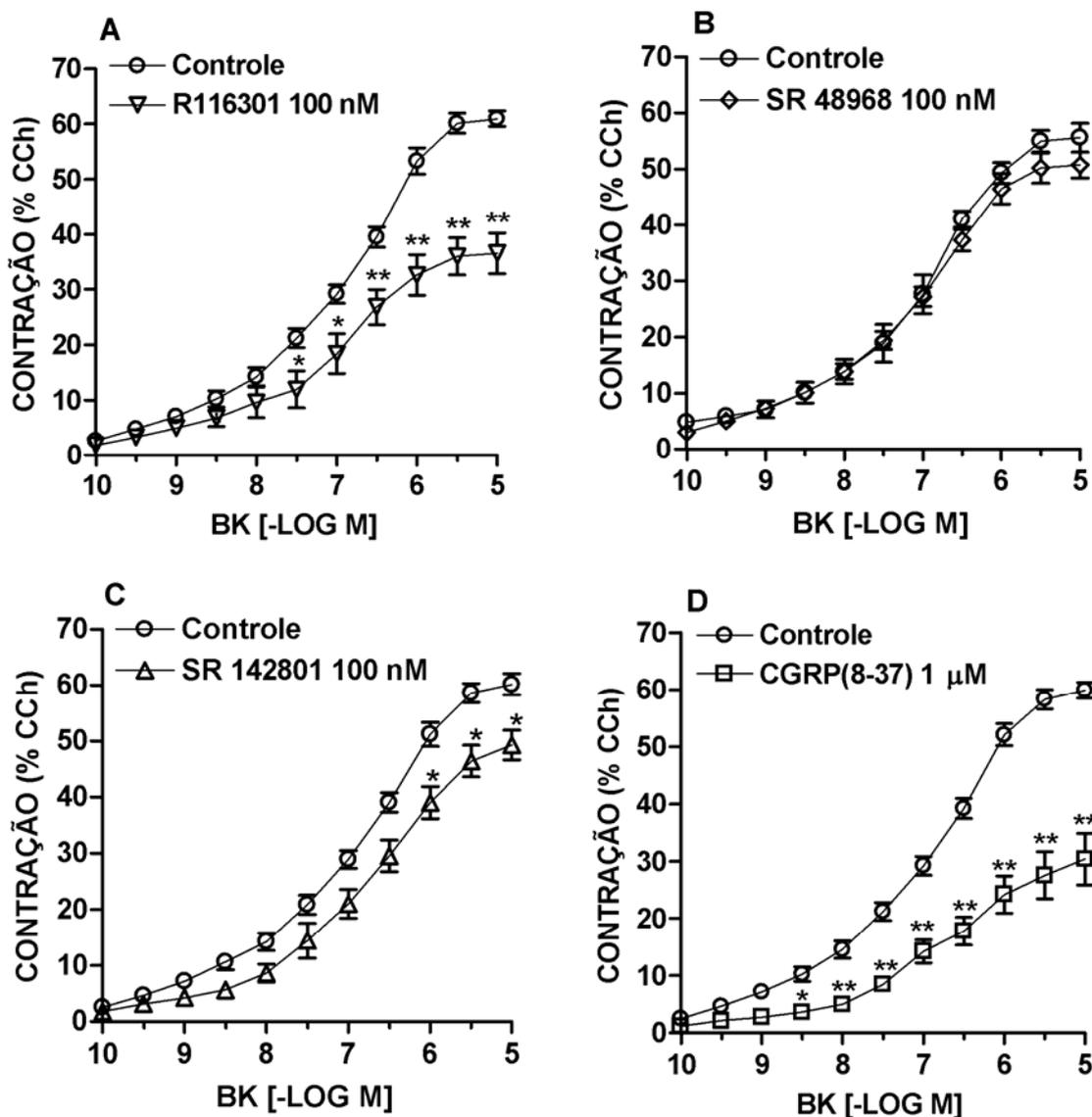


Figura 8. Papel dos neuropeptídeos e do CGRP na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos obtidas na ausência ou presença dos antagonistas (A) NK_1 R116301 (100 nM), (B) NK_2 SR48968 (100 nM), (C) NK_3 SR142801 (100 nM) ou (D) CGRP fragmento CGRP₍₈₋₃₇₎ (1 μM) 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.6. Contribuição dos receptores vanilóides sobre a resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos

Com o objetivo de verificar a possível participação do receptor vanilóide TRPV1 na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) 90 min após a montagem das preparações, na ausência ou na presença dos antagonistas vanilóides capsazepina (1 μ M) ou SB366791 (10 μ M). Os resultados da **figura 9** indicam que ambos os antagonistas capsazepina (**Figura 9 A**) e SB366791 (**Figura 9 B**) foram capazes de reduzir de maneira significativa a resposta contrátil induzida pela BK, com inibição da $R_{\text{máx}}$ de $32,32 \pm 4,73$ e $40,26 \pm 3,55$ %, respectivamente.

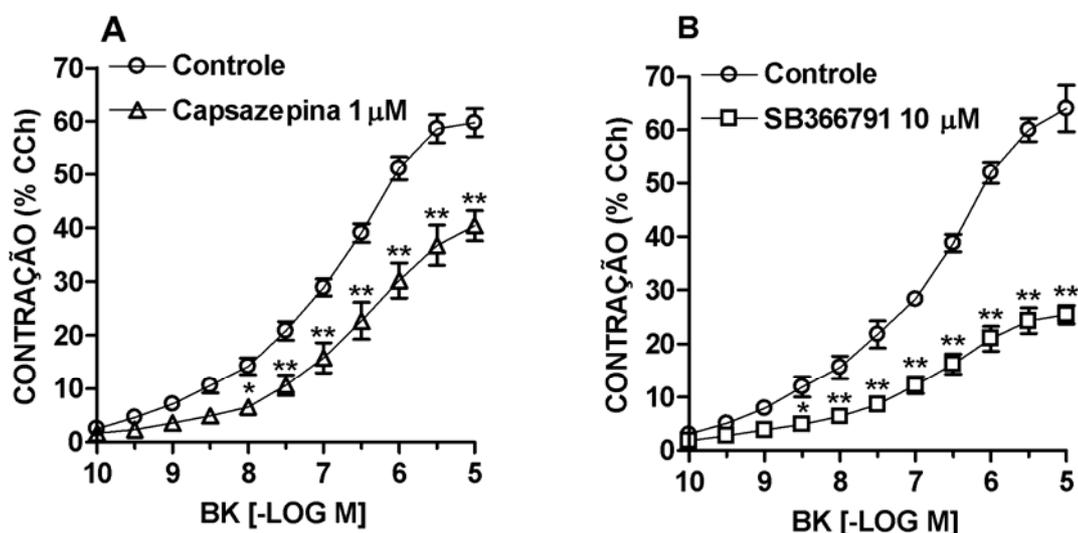


Figura 9. Papel do receptor vanilóide TRPV1 na resposta contrátil induzida pela BK em cólons isolados de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos obtidas na ausência ou presença dos antagonistas (A) capsazepina (1 μ M) ou (B) SB366791 (10 μ M) 90 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste "t" de Student não pareado).

4.7. Avaliação da indução *in vitro* do receptor B₁ para as cininas em cólons de camundongos

Inúmeros estudos indicam a propriedade do receptor B₁ para as cininas de ser induzido durante a incubação *in vitro* em preparações obtidas de diferentes tecidos, sendo que este fenômeno normalmente ocorre de maneira tempo-dependente (para revisão ver: Calixto *et al.*, 2004). Para verificar se tal processo também ocorre no cólon isolado de camundongo, foram realizadas curvas concentração-resposta simples de contração para o agonista seletivo do receptor B₁ a des-Arg⁹-BK (1 μM) após diferentes intervalos de tempo após a montagem das preparações (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas; as preparações foram testadas com o agonista uma única vez). Os resultados da **figura 10** mostram aumento da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK de maneira tempo-dependente, sugerindo a ativação do processo de indução *in vitro* do receptor B₁ no cólon isolado de camundongo. Nos tempos avaliados foi observada resposta contrátil máxima em 6 horas, sendo que esta resposta manteve-se sustentada até pelo menos 8 horas.

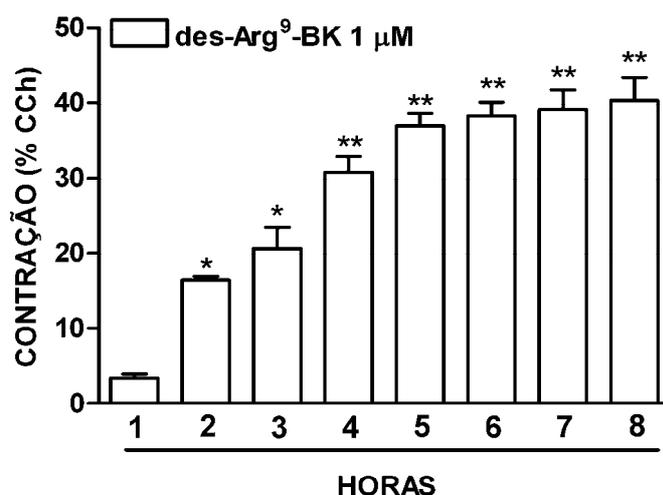


Figura 10. Avaliação da indução *in vitro* do receptor B_1 para as cininas em cólons de camundongos. Foram realizadas curvas concentração-resposta simples de contração para a des-Arg⁹-BK (1 μM) após diferentes intervalos de tempo de montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.8. Estudo dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos

A fim de caracterizar os subtipos de receptores envolvidos na contração induzida pela des-Arg⁹-BK no cólon de camundongos foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) 6 horas após a montagem das preparações, na ausência ou na presença do antagonista seletivo para o receptor B_1 o R715 (1-10 nM) ou do antagonista seletivo para o receptor B_2 , o FR173657 (100 nM). Os dados da **figura 11 A** indicam que o antagonista do receptor B_1 R715 (1-10 nM) promoveu redução na $R_{máx}$ à des-Arg⁹-BK de maneira concentração-dependente. Além disso, foi observado na presença do R715 o antagonismo do tipo competitivo com características de irreversibilidade. Por

outro lado, a avaliação da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK na presença do antagonista do receptor B₂ o FR173657 não interferiu de forma significativa na resposta contrátil no cólon isolado de camundongo (**Figura 11 B**).

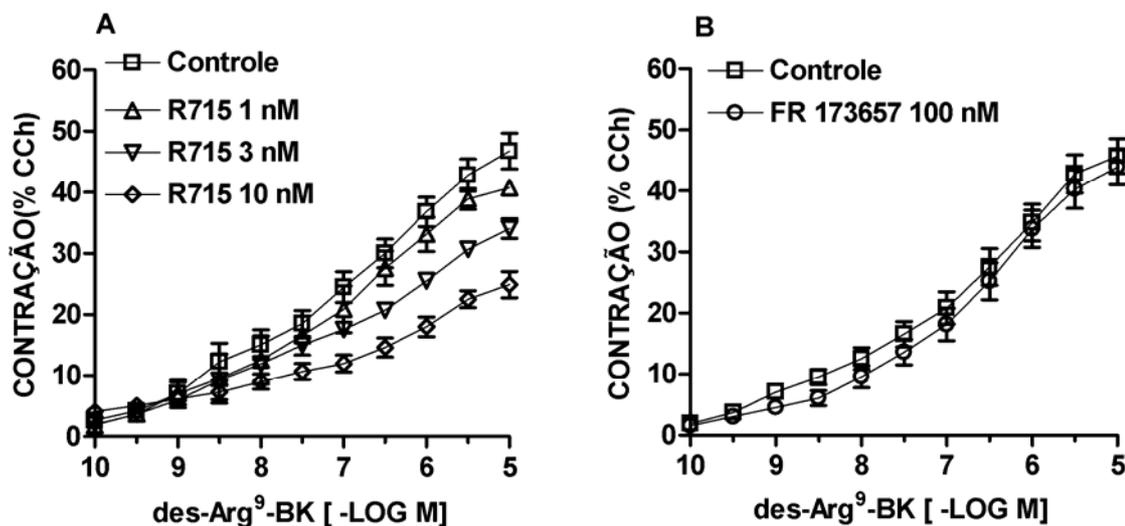


Figura 11. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos. Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos na ausência ou na presença de (A) R715 (1-10 nM) ou (B) FR173657 (100 nM) 6 horas após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6).

Visando analisar a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK (1 μ M), em cólons de camundongos após 6h de montagem, na presença de outros antagonistas seletivos para o receptor B₁, as preparações de cólons foram incubadas com os antagonistas des-Arg⁹-Leu⁸-BK (30 μ M), SSR 240612 (30 nM) ou com o composto Benzodiazepínico-1 (BZ-1) (30 nM).

Os resultados da **Figura 12** demonstram que os antagonistas seletivos para o receptor B₁ foram capazes de reduzir de forma significativa a resposta contrátil

induzida pela des-Arg⁹-BK (1 μM) em cólons de camundongos com inibição da R_{máx} de 58,64 ± 5,55 ; 68,50 ± 2,36 ; 45,02 ± 5,34 %, respectivamente.

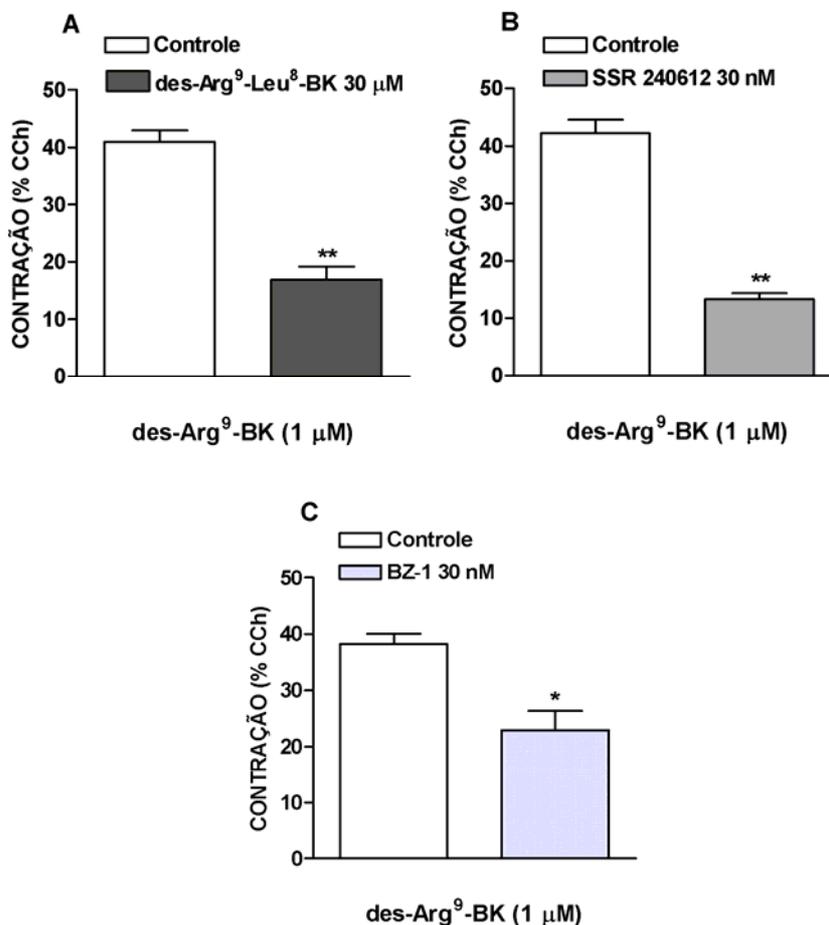


Figura 12. Efeito dos antagonistas seletivos para o receptor B₁ das cininas sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos. Respostas contráteis obtidas para a des-Arg⁹-BK (1 μM) em cólons de camundongos na ausência ou na presença de (A) des-Arg⁹-Leu⁸-BK (30 μM), (B) SSR 240612 (30 nM) ou (C) Benzodiazepínico-1 (BZ-1) (30 nM) 6 horas após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.9. Caracterização da colite experimental induzida por TNBS em cólons de camundongos

A fim de caracterizar a evolução da colite induzida pelo TNBS em camundongos foi avaliado o dano macroscópico e a migração celular após diferentes intervalos de tempo (0,5 - 96 horas) após a indução. A administração intra-colônica de TNBS causou dano tecidual nos cólons dos camundongos, sendo que a intensidade das lesões aumentou em função do tempo do tratamento (**Figura 13 A**). De maneira similar, a avaliação da atividade da MPO indicou ativação tempo-dependente do processo de migração celular após a indução da colite por TNBS (**Figura 13 B**). Durante as condições basais o cólon apresentou ausência de lesões e reduzida quantidade de células. Todavia, a partir de 30 min foi verificado aumento significativo no *score* macroscópico, indicando dano tecidual. Esta resposta atingiu efeito máximo em 8 horas, permanecendo elevada por pelo menos 72 h após a administração de TNBS. Por sua vez, a migração de leucócitos para o cólon aumentou 2 horas após a administração do TNBS, atingindo resposta máxima em 12 horas e mantendo-se significativamente elevada por pelo menos 96 h após a indução da colite.

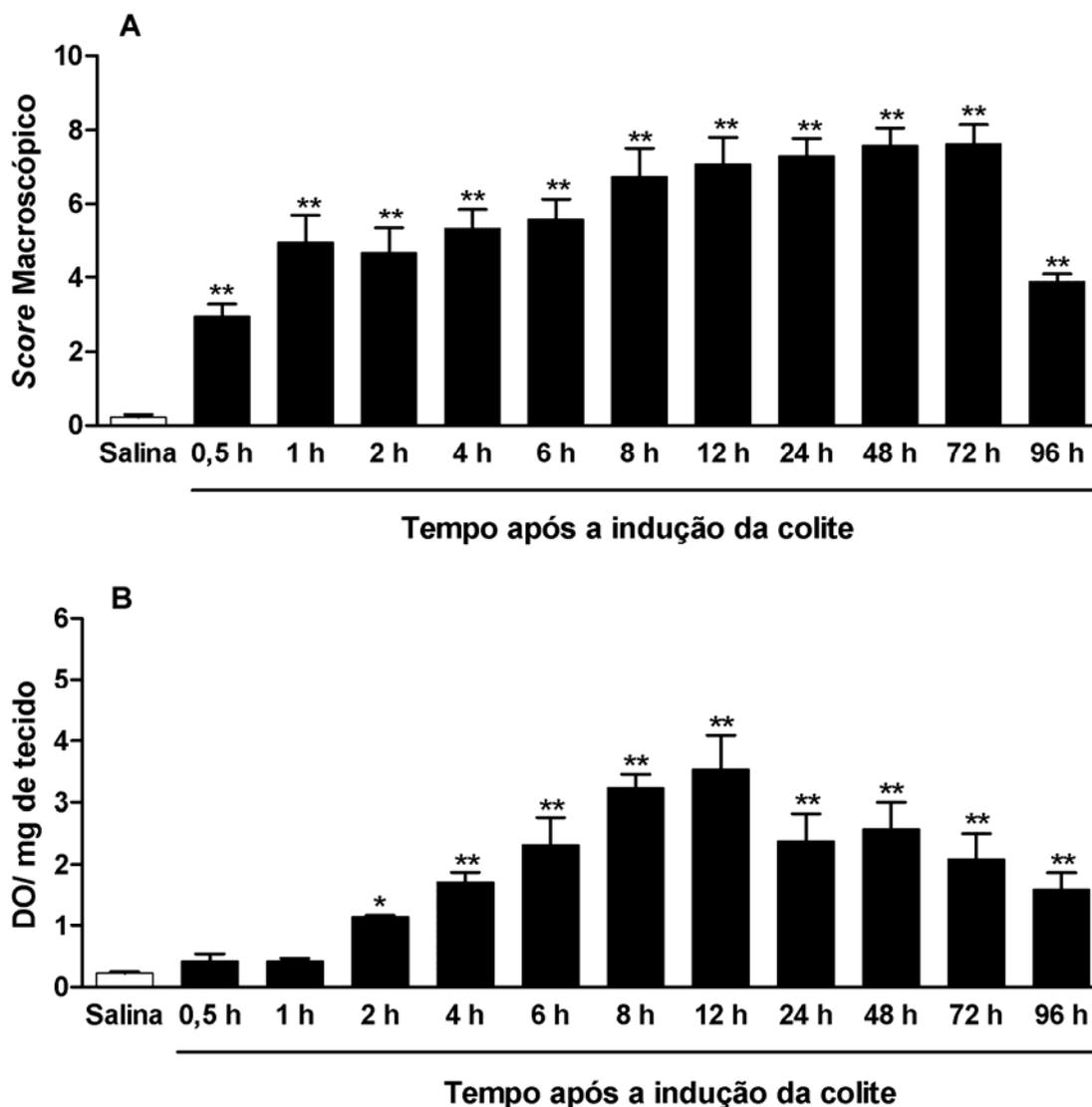


Figura 13. Avaliação do dano macroscópico e da atividade da MPO em cólons de camundongos com colite experimental induzida pelo TNBS. (A) Avaliação temporal do dano tecidual (score macroscópico) em cólons de camundongos após a administração intra-retal de TNBS. (B) Avaliação temporal da atividade da MPO após a indução da colite pelo TNBS. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo salina (post-hoc Newman-Keul's).

Com o intuito de identificar o dano tecidual microscópico provocado pela indução da colite por TNBS, foram realizados cortes histológicos em amostras de cólons normais ou com colite de 24 ou 72 h, como demonstrado na **figura 14**. Os resultados ilustrados na **figura 14 D** indicam um aumento significativo do score

microscópico em 24 e 72 h. O aumento do score microscópico evidenciado em 72 h foi 1,32 vezes maior que o em 24 h e 12,77 vezes maior que o valor encontrado no grupo salina.

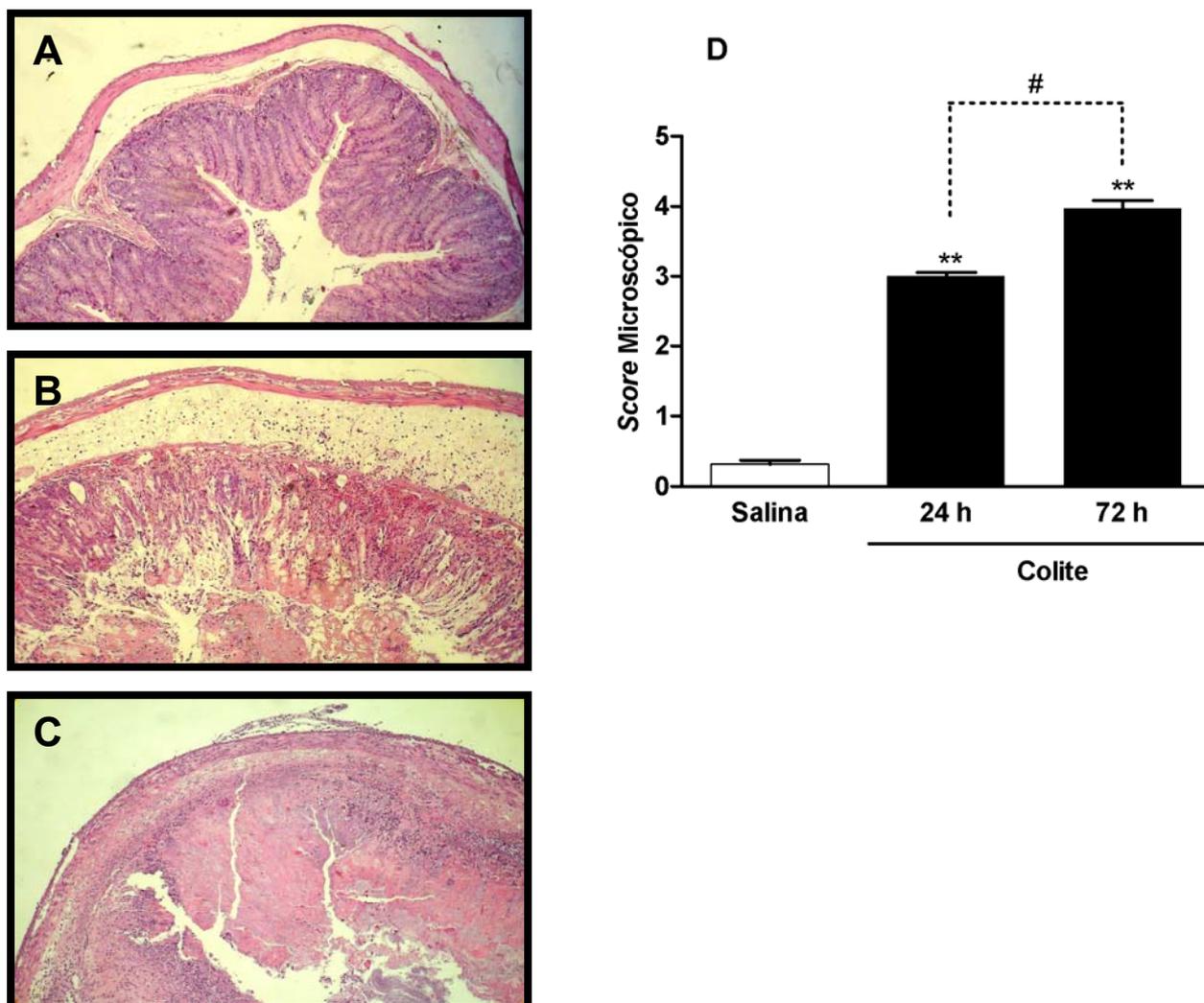


Figura 14. Avaliação do dano microscópico em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Imagem representativa da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (A) salina, (B) TNBS por 24 h e (C) TNBS por 72 h. Imagens com aumento de 4 x em A e C e 10 x em B. (D) Score microscópico das lesões induzidas pelo TNBS em cólons de camundongos. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo salina; #P<0,05 comparado ao grupo TNBS 24 h (post-hoc Newman-Keul's).

4.10. Avaliação da expressão dos receptores B₁ e B₂ para as cininas em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS

Com o objetivo de estudar possíveis alterações nas respostas contráteis à BK em cólons inflamados, a colite foi induzida por TNBS em diferentes tempos de 6-96 h. Nos devidos tempos, os cólons foram montados em cubas para órgão isolado e testados com BK (1 μ M). A **figura 15 A** demonstra aumento na resposta contrátil tempo dependente onde a R_{máx} para a BK (1 μ M) (108,01 \pm 4,57 %) foi encontrada na colite de 72 h, essa resposta foi 2,6 vezes maior do que aquela observada em cólons de animais controle. Em um novo grupo experimental, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a BK (0,1-10.000 nM) em cólons controle (sem colite) e com colite obtidos 72 h após a indução. Os resultados da **figura 15 B** evidenciam aumento de cerca de 1,75 vezes na resposta contrátil à BK no grupo colite de 72 h, quando comparado com o grupo controle (R_{máx} de 98,33 \pm 5,20 e 56,25 \pm 2,82 %, respectivamente). Os valores das CE_{50s} obtidos foram 30,92 (7,63-125,31) nM em preparações com colite e de 83,37(33,41-207,50) nM em preparações controle.

Visando analisar a resposta funcional mediada pelo receptor B₁ na colite induzida por TNBS, respostas contráteis para a des-Arg⁹-BK (1 μ M) foram obtidas em diferentes tempos após a indução da colite (6 -96 h). A **figura 15 C** demonstra aumento tempo-dependente da resposta contrátil onde a R_{máx} para a des-Arg⁹-BK (1 μ M) (55,50 \pm 4,90 %) foi evidenciada em cólons obtidos 72 h após a indução da colite. Na realização de curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) (**Figura 15 D**) foi evidenciado aumento de 20,12 vezes na resposta contrátil dos cólons com colite de 72 h quando comparado com a resposta

dos cólons controle. O valor da CE_{50} para a $des-Arg^9$ -BK (0,1-10.000 nM) na colite foi 18,1 (3,2 – 101,8) nM.

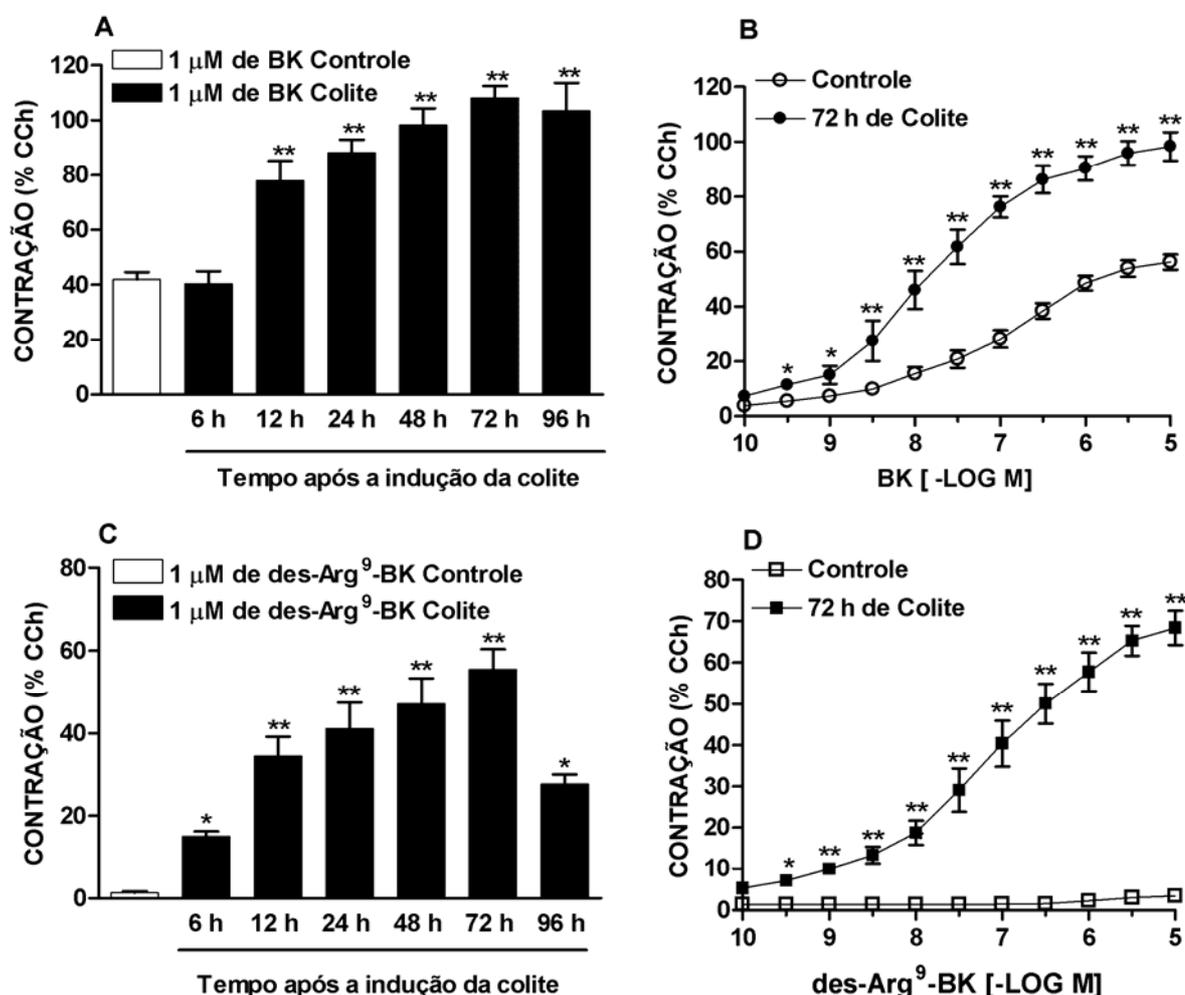


Figura 15. Análise da resposta contrátil induzida pelas cininas em cólons de camundongos controle ou com colite induzida por TNBS. (A) Respostas contráteis obtidas para a BK (1μM) em cólons de camundongos em diferentes tempos de colite experimental (6-96 h). (B) Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos sem colite (controle) ou com colite experimental após 72 h de indução. (C) Avaliação das respostas contráteis obtidas para a $des-Arg^9$ -BK (1μM) em cólons de camundongos em diferentes tempos de colite experimental (6-96 h). (D) Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para $des-Arg^9$ -BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos sem colite (controle) ou com colite experimental após 72 h de indução. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

Posteriormente, foram analisadas as possíveis alterações na afinidade dos receptores para as cininas pelos seus ligantes, bem como, possíveis mudanças na expressão destes receptores, 72 horas após a administração intra-colônica de TNBS (**Figura 16**). Através do ensaio de união específica utilizando a [³H]-BK (0,03-10 nM) foi possível verificar que membranas celulares obtidas de cólons de animais tratados com salina (controle) apresentaram $B_{máx}$ de $57,63 \pm 16,09$ fmol/mg de proteína e K_d de 1,1 (0,57-1,91 nM; com intervalo de confiança de 95%). Entretanto, as membranas celulares provenientes de animais com colite apresentaram $B_{máx}$ de $129,89 \pm 27,15$ fmol/mg de proteína e K_d de 0,83 (0,25 - 2,63 nM; com intervalo de confiança de 95%). Tais resultados demonstram que a colite induzida pelo TNBS (após 72 h) causou aumento de 2,25 vezes no número de receptores B_2 , sem modificar significativamente a afinidade entre ligante-receptor (**Figura 16 A**).

Complementando os dados funcionais, a análise de união específica com o ligante para o receptor B_1 radiomarcado ([³H]-des-Arg¹⁰-calidina; 0,03 - 10 nM) demonstrou que membranas celulares de cólons controles apresentam $B_{máx}$ de $2,85 \pm 0,47$ fmol/mg de proteína e K_d de 4,14 (2,86 - 6,01, nM; com intervalo de confiança de 95%). Todavia, a análise dos cólons obtidos após 72 h de colite por TNBS apresentou $B_{máx}$ de $5,33 \pm 0,41$ fmol/mg de proteína e K_d de 3,65 (3,49 - 3,82 nM; com intervalo de confiança de 95%). Os resultados desse experimento indicam que durante a colite houve aumento de 1,9 vezes na densidade dos receptores B_1 , sem modificar a afinidade entre ligante-receptor (**Figura 16 B**).

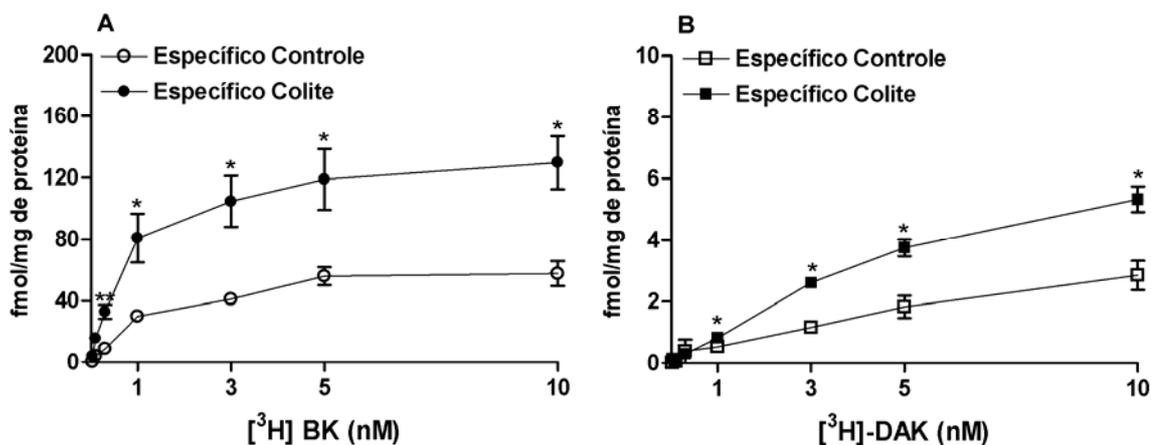


Figura 16. Avaliação da união específica para os receptores das cininas em cólons de camundongos controle ou com colite induzida por TNBS. (A) Valores da união específica obtidos na utilização da [³H]-BK (0,03-10 nM) em membranas de cólons sem colite (controles) ou em cólons obtidos após 72 h de indução da colite. (B) Valores da união específica obtidos na utilização da [³H]-DAK (0,03-10 nM) em membranas de cólons sem colite (controles) ou em cólons obtidos após 72 h de indução da colite. Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 5-8). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

Finalmente, com o objetivo de confirmar o processo de indução dos receptores B₁ e B₂ durante a colite experimental induzida pelo TNBS, os níveis de RNAm para esses receptores foram quantificados após diferentes tempos de colite (6-96 h). Os resultados da Figura 17 (A e B) indicam que durante condições basais os níveis de RNAm para o receptor B₂ encontraram-se elevados, confirmando seu caráter tecidual constitutivo. Contudo, após a indução da colite pelo TNBS foi observado aumento nos níveis do RNAm para o receptor B₂, sendo a expressão máxima observada 12 h após a indução. Por outro lado, na condição basal, o cólon de camundongo expressa níveis baixos de RNAm para o receptor B₁. Entretanto, a análise temporal indica aumento significativo desses níveis em cólons obtidos após 6 h de indução da colite, estando reduzidos em cólons obtidos em 96 h após o início da colite (Figura 17 C e D).

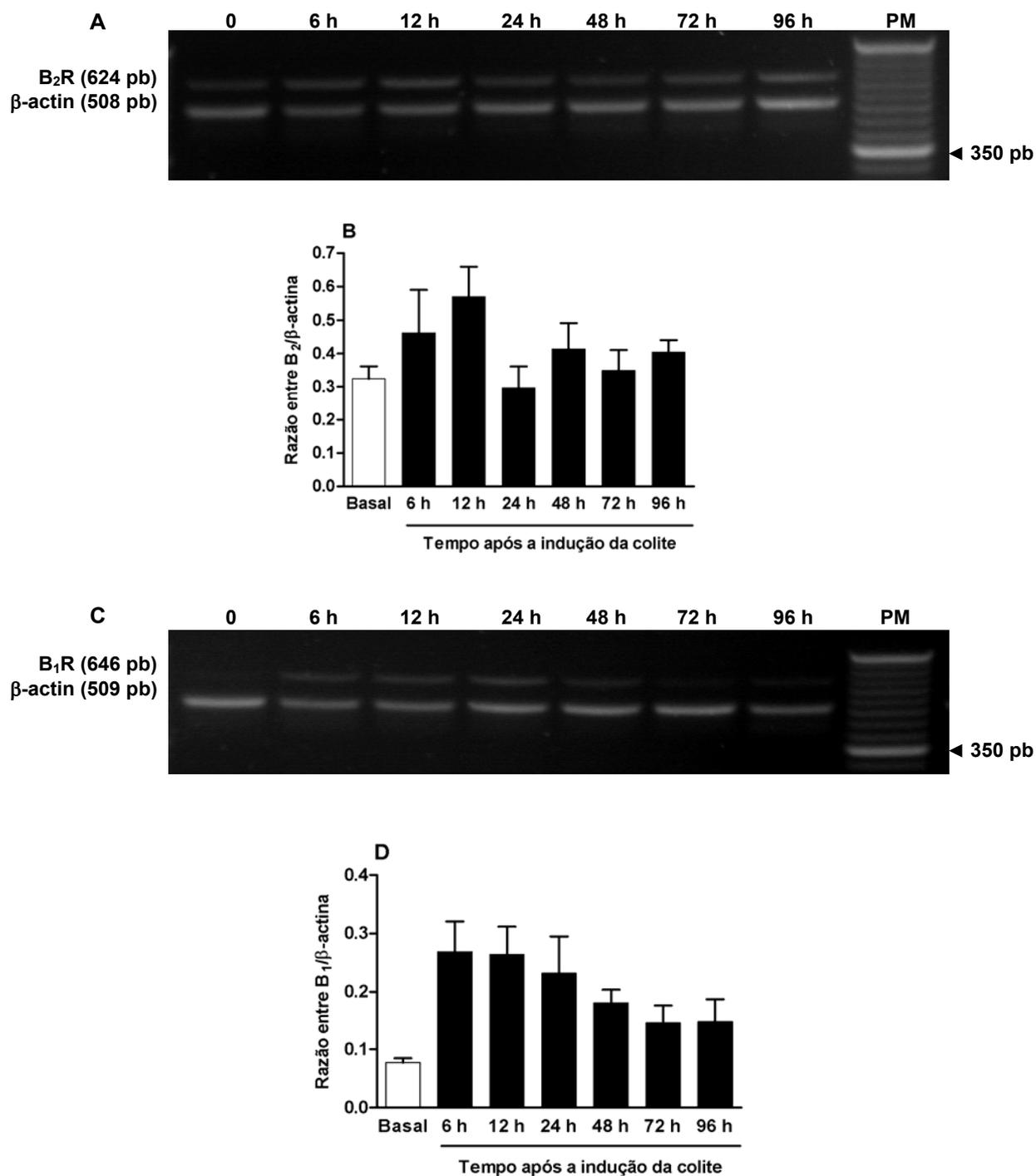


Figura 17. Avaliação da expressão do RNAm para os receptores das cininas em cólons de camundongo com colite induzida por TNBS. (A) Fotografia das bandas obtidas na eletroforese para análise semi-quantitativa do RNAm para o receptor B₂. (B) Razão entre o RNAm do receptor B₂ e o da β-actina. (C) Fotografia das bandas obtidas na eletroforese para análise semi-quantitativa do RNAm para o receptor B₁. (D) Razão entre o RNAm do receptor B₁ e o da β-actina. (N=3).

4.11. Papel dos receptores para as cininas na colite induzida por TNBS

Para avaliar a possível contribuição dos receptores B_1 e B_2 para as cininas na indução da colite por TNBS, foi realizada análise macroscópica e atividade da MPO em cólons de camundongos com deleção gênica para os receptores B_1 ($B_1R^{-/-}$) ou B_2 ($B_2R^{-/-}$) obtidos 72 h após a indução da colite com TNBS. Os resultados da **figura 18 A** demonstram redução significativa dos escores macroscópicos em ambos os animais $B_2R^{-/-}$ ($46,77 \pm 3,45$ %) ou $B_1R^{-/-}$ ($55,24 \pm 3,63$ %) quando em comparação aos animais da linhagem controle (C57/BL6). Ademais, na avaliação da atividade da MPO foi observada redução significativa na atividade enzimática somente nos cólons inflamados provenientes dos camundongos $B_1R^{-/-}$ (redução de $54,08 \pm 7,05$ %) quando comparados aos controles C57/BL6 (**Figura 18 B**). Em conjunto, esses dados sugerem a possível contribuição de ambos os receptores para as cininas durante o processo de colite induzida pelo TNBS.

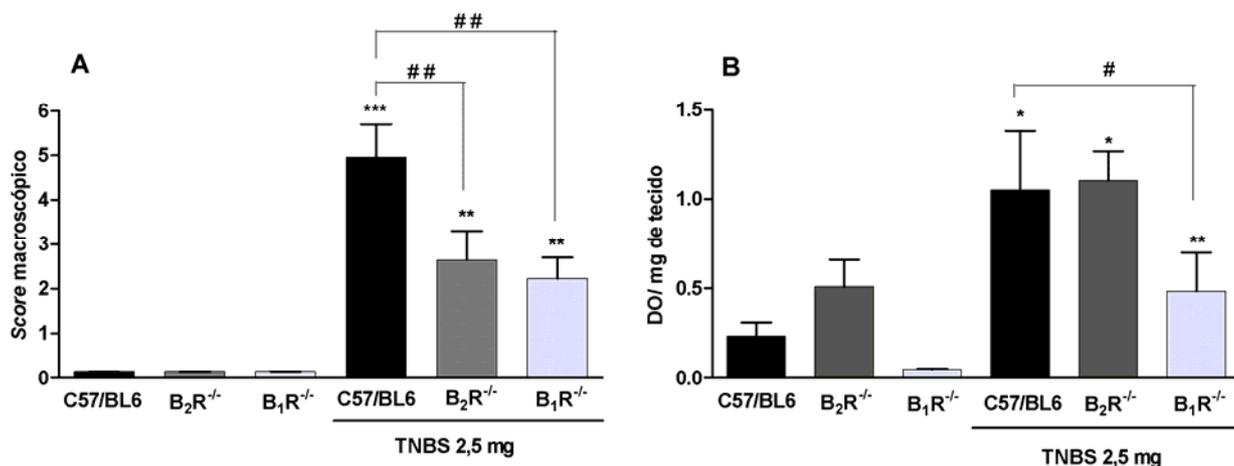


Figura 18. Avaliação do dano macroscópico e da atividade da MPO em cólons de camundongos com deleção gênica para os receptores das cininas com colite induzida por TNBS. Avaliação (A) do dano tecidual e (B) da atividade da MPO em cólons obtidos 72h após a indução da colite. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($N = 6$). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo C57/BL6 (post-hoc Newman-Keul's).

4.12. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução *in vivo* do receptor B₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel dos inibidores de síntese proteica

Com o objetivo de avaliar alguns dos mecanismos intracelulares envolvidos na indução do receptor B₁ durante a colite por TNBS, os animais foram tratados *in vivo* (desde o jejum) com o glicocorticóide dexametasona (1 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) ou com o inibidor da síntese proteica cicloheximida (2,5 mg/kg, 2 vezes ao dia, i.p.). Setenta e duas horas após a indução da colite com TNBS, os cólons foram montados em cubas para órgão isolado e após 60 min, realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para o agonista seletivo do receptor B₁ a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) ou realizada análise histológica nos cólons. Os resultados da **figura 19** demonstram que o tratamento com dexametasona (**Figura 19 A**) ou com a cicloheximida (**Figura 19 B**) foi capaz de reduzir significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK, com inibição da R_{máx} em 83,23 ± 1,83 e 38,74 ± 5,65 % em relação aos animais controle (colite sem tratamento), respectivamente. Além disso, a análise histológica revelou que ambos os tratamentos com dexametasona ou com cicloheximida, foram capazes de reduzir o dano tecidual induzido pela administração do TNBS no cólon dos camundongos (**Figura 19 C-E**).

Complementarmente, em outra série de experimentos, foi estudado o efeito *in vitro* da dexametasona ou da cicloheximida em cólons de animais com colite obtidos após 72 h de inflamação. Para tal, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM), 60 min após a montagem das preparações, na ausência ou na presença de dexametasona (100 µM) ou de cicloheximida (70 µM). Como esperado, os resultados obtidos desses experimentos

demonstraram que a adição *in vitro* de dexametasona ou cicloheximida não alterou a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK (resultados não mostrados), confirmando que o receptor B₁ foi sintetizado *in vivo* após a indução da colite com TNBS.

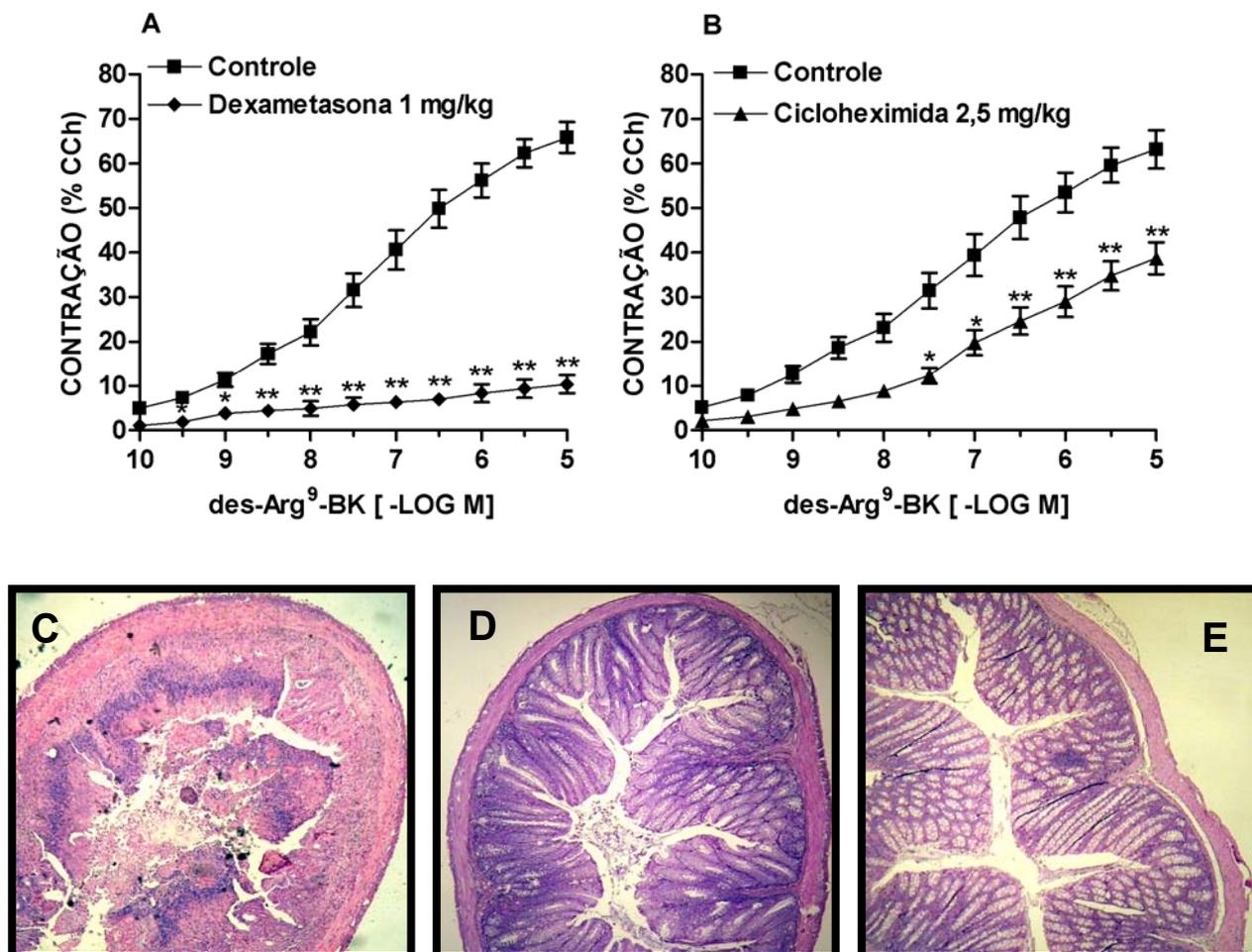


Figura 19. Efeito dos inibidores de síntese protéica sobre a indução do receptor B₁ *in vivo* em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons provenientes de camundongos tratados com (A) dexametasona (1 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) ou (B) cicloheximida (2,5 mg/kg, 2 vezes ao dia, i.p.) obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. As respostas contrateis à des-Arg⁹-BK foram realizadas 60 min após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (colite) (teste “t” de Student não pareado). Fotografias representativas da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (C) salina, (D) dexametasona (1 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) ou (E) cicloheximida (2,5 mg/kg, 2 vezes ao dia, i.p.) avaliadas 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Imagens com aumento de 4 x.

4.13. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução *in vivo* do receptor B₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel da fosfatidil inositol-3-quinase γ (PI3K γ)

Com o intuito de avaliar a participação da via PI3K γ na indução do receptor B₁ pelo TNBS, os animais foram tratados desde o jejum *in vivo* com o inibidor seletivo da PI3K γ o AS605240 (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.). Após o tratamento, seguimentos de os cólons obtidos 72 h após a indução da colite foram montados em cubas para órgão isolado e realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM). Os resultados da **Figura 20 A** demonstram redução na R_{máx} conferida pelo tratamento com AS605240 (47,02 \pm 4,40 %) quando comparado ao controle (colite sem tratamento). Ademais, a análise microscópica revelou que o tratamento com AS605240 foi capaz de reduzir a lesão induzida pela colite com o TNBS nos cólons dos camundongos (**Figura 20 B e C**).

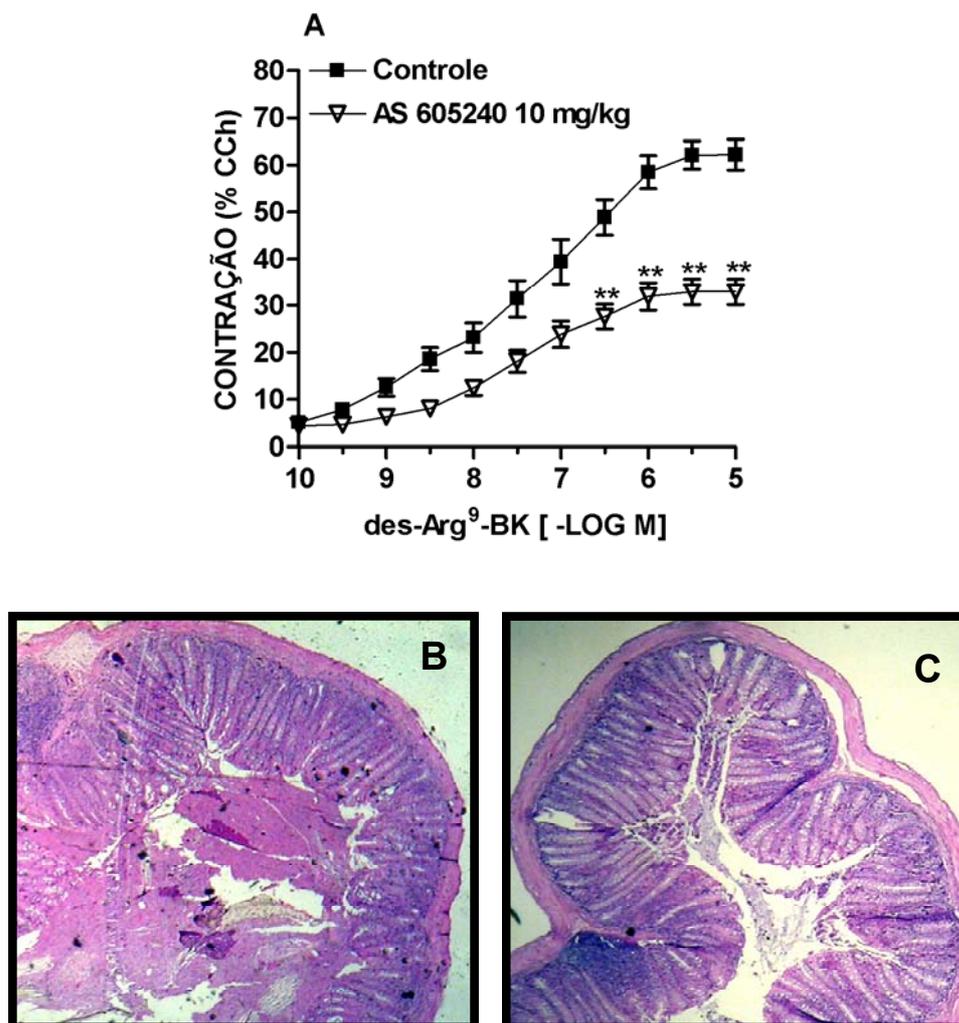


Figura 20. Efeito do inibidor da fosfatidil inositol-3-quinase γ (PI3K γ) sobre a indução do receptor B $_1$ in vivo em camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg 9 -BK (0,1-10.000 nM) em cólons provenientes de camundongos tratados com (A) AS605240 (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.) 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. As curvas de contração à des-Arg 9 -BK foram realizadas 60 min após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (colite) (teste "t" de Student não pareado). Fotografias representativas da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (B) salina ou (C) AS605240 (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, v.o.) avaliadas 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Imagens com aumento de 4 x.

4.14. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução *in vivo* do receptor B₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel do fator nuclear- κ B (NF- κ B)

Na seqüência, foi avaliado o possível envolvimento da via de sinalização intracelular do NF- κ B na indução do receptor B₁ durante a colite induzida pelo TNBS, através do tratamento *in vivo* (desde o jejum) com o inibidor PDTC (30 mg/kg, 1 vez ao dia, i.p.). Os resultados da **Figura 21 A** demonstram que o tratamento com o PDTC foi capaz de reduzir significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM), com redução da R_{máx} em 53,90 ± 5,24 % em relação aos animais colite (controles). Além disso, a análise histológica demonstrou que o tratamento com PDTC reduziu o dano tecidual provocado pela administração de TNBS no cólon dos camundongos (**Figura 21 B e C**).

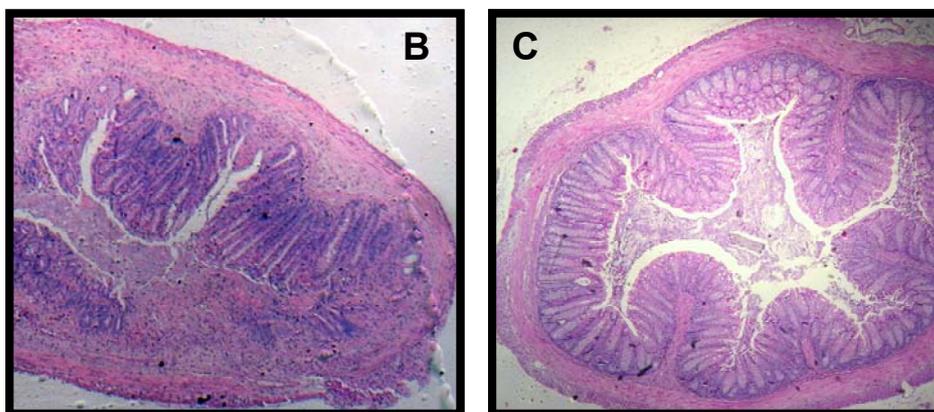
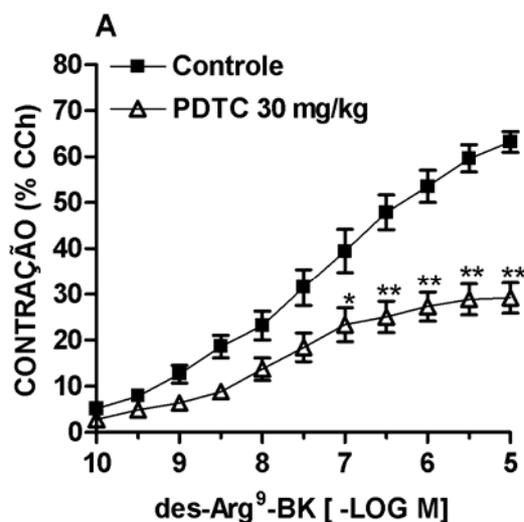
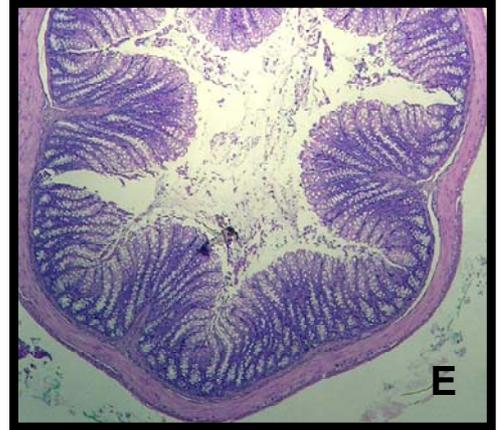
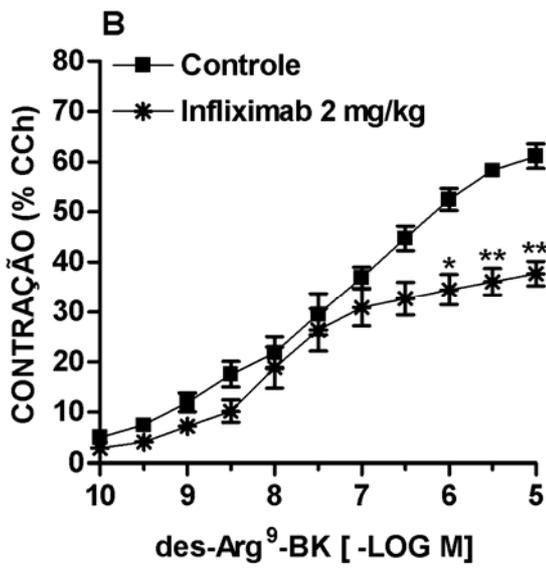
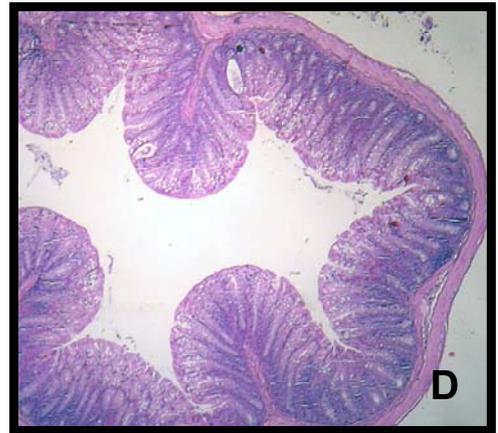
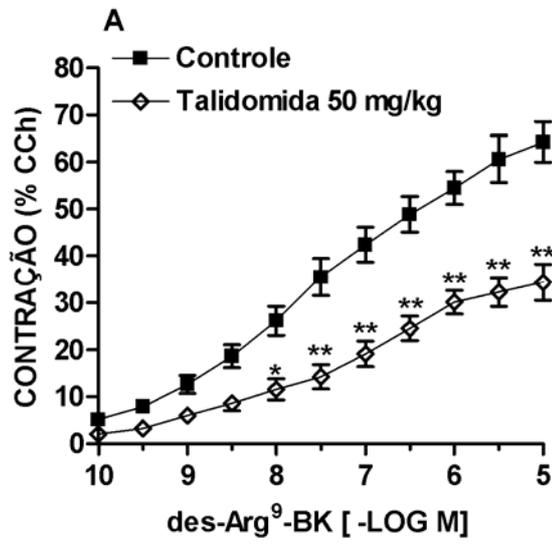


Figura 21. Efeito do inibidor do fator nuclear κB (NF- κB) sobre a indução do receptor B_1 in vivo em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons provenientes de camundongos tratados com (A) PDTC (30 mg/kg, 1 vez ao dia, i.p.) obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. As curvas de contração à des-Arg⁹-BK foram realizadas 60 min após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (colite) (teste "t" de Student não pareado). Fotografias representativas da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (B) salina ou (C) PDTC (30 mg/kg, 1 vez ao dia, i.p.) avaliadas 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Imagens com aumento de 4 x.

4.15. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução *in vivo* do receptor B₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel do fator de necrose tumoral- α (TNF α)

Com o objetivo de avaliar a possível participação da citocina TNF α na indução do receptor B₁ durante a colite induzida pelo TNBS, os animais foram tratados desde o jejum *in vivo* com o inibidor do TNF α a talidomida (50 mg/kg, 1 vez ao dia, v.o.) ou com o anticorpo quimérico anti-TNF α o infliximab (2 mg/kg, 1 vez ao dia, s.c.). Os resultados da **figura 22** demonstram que o tratamento com a talidomida (**Figura 22 A**) ou com o infliximab (**Figura 22 B**) foi capaz de reduzir significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM), com redução da R_{máx} em 46,45 ± 6,02 e 38,09 ± 4,92 % em relação aos controles (colite não tratados), respectivamente. Além disso, a análise histológica revelou que ambos os tratamentos, talidomida ou infliximab, foram capazes de reduzir a lesão induzida pela administração de TNBS no cólon dos camundongos (**Figura 22 C-E**).

Posteriormente, a fim de comprovar a participação do TNF α no processo de indução do receptor B₁ durante a colite foram utilizados animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α (TNF α p55^{-/-}). Os resultados da **figura 22 F** demonstram que cólons com colite obtidos de animais TNF α p55^{-/-} apresentaram resposta contrátil reduzida à des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em relação aos cólons com colite de animais da linhagem controle C57/BL6, em 72 h após a administração de TNBS. A R_{máx} para a des-Arg⁹-BK foi 55,04 ± 6,79 % menor nos animais TNF α p55^{-/-} quando comparados aos animais C57/BL6.



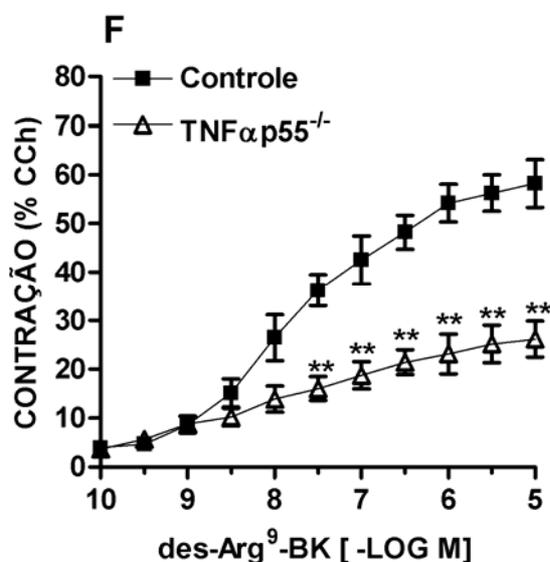


Figura 22. Papel do fator de necrose tumoral- α (TNF α) sobre a indução do receptor B₁ in vivo em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons provenientes de camundongos tratados com (A) talidomida (50 mg/kg, 1 vez ao dia, v.o.) ou (B) infliximab (2 mg/kg, 1 vez ao dia, s.c.) obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Fotografias representativas da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (C) salina, (D) talidomida (50 mg/kg, 1 vez ao dia, v.o.) ou (E) infliximab (2 mg/kg, 1 vez ao dia, s.c.) avaliadas 72 horas após a indução da colite por TNBS. Imagens com aumento de 4 x. (F) Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos controle (C57/BL6) ou TNF α p55^{-/-} obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. As curvas de contração à des-Arg⁹-BK foram realizadas 60 min após a montagem in vitro. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle com colite (teste "t" de Student não pareado).

4.16. Estudo dos mecanismos envolvidos na indução *in vivo* do receptor B₁ na colite induzida pelo TNBS em cólons de camundongos: papel da óxido nítrico sintase indutível (iNOS)

Com o objetivo de avaliar a possível participação da enzima iNOS na indução do receptor B₁ durante a colite induzida pelo TNBS, foram utilizadas ferramentas farmacológicas e genéticas. Quanto à primeira, animais foram tratados desde o jejum *in vivo* com o inibidor seletivo da iNOS 1400W (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.). Além disso, foram utilizados animais com deleção gênica para a enzima iNOS (iNOS^{-/-}). Os resultados da **figura 23** demonstram que tanto o tratamento farmacológico com 1400W (**Figura 23 A**) quanto a deleção gênica da iNOS (**Figura 23 D**), foram capazes de reduzir significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK, com redução da R_{máx} em 32,85 ± 4,21 e 44,84 ± 4,80 % em relação aos cólons dos animais controle (colite sem tratamento ou colite nos animais C57/BL6), respectivamente. Além disso, a análise histológica revelou que o tratamento com 1400W foi capaz de reduzir a lesão tecidual induzida pela administração de TNBS nos cólons dos camundongos (**Figura 23 B e C**).

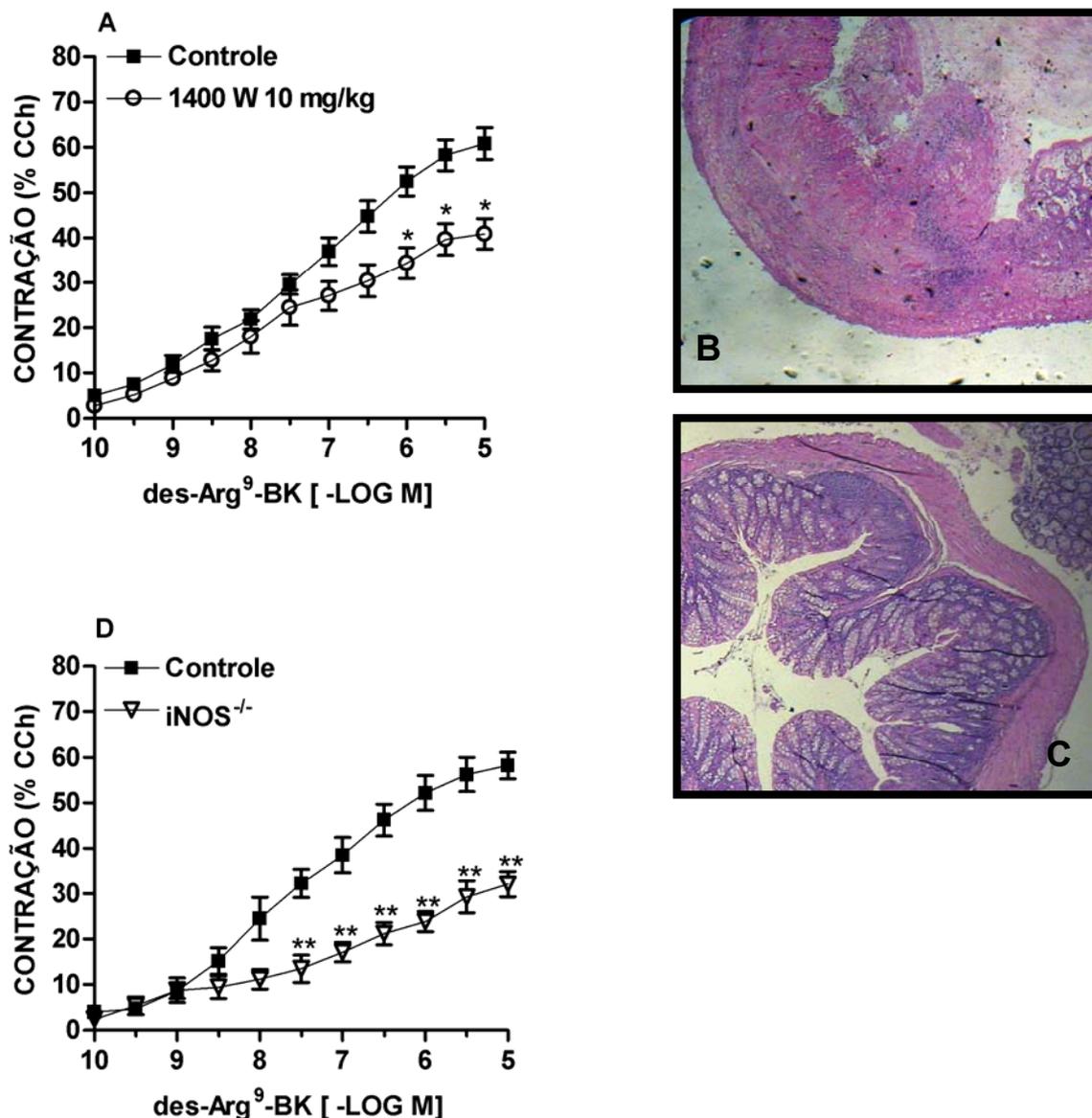


Figura 23. Papel da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) sobre a indução do receptor B₁ in vivo em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons provenientes de camundongos tratados com (A) 1400W (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Fotografias representativas da análise histológica do cólon de camundongos tratados com (B) salina ou (C) 1400W (10 mg/kg, 2 vezes ao dia, s.c.) avaliadas 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Imagens com aumento de 4 x. (D) Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos controle (C57/BL6) ou iNOS^{-/-} obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. As curvas de contração à des-Arg⁹-BK foram realizadas 60 min após a montagem in vitro. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle com colite (teste “t” de Student não pareado).

4.17. Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores B₁ e B₂ sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS

A fim de caracterizar os subtipos de receptores envolvidos na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK no cólon de camundongos após a administração intra-colônica de TNBS, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons obtidos 72 horas após a indução da colite na ausência, ou na presença do antagonista seletivo para o receptor B₁ R715 (1-10 nM) ou do antagonista seletivo para o receptor B₂ FR173657 (100 nM). Os dados da **figura 24 A** indicam que o antagonista do receptor B₁ R715 (1-10 nM) promoveu redução da R_{máx} para a des-Arg⁹-BK de maneira concentração-dependente. Além disso, novamente constataram-se características de antagonismo do tipo competitivo irreversível. Por outro lado, a avaliação da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK na presença do antagonista do receptor B₂ FR173657 não interferiu de forma significativa na resposta contrátil no cólon isolado de camundongo (**Figura 24 B**).

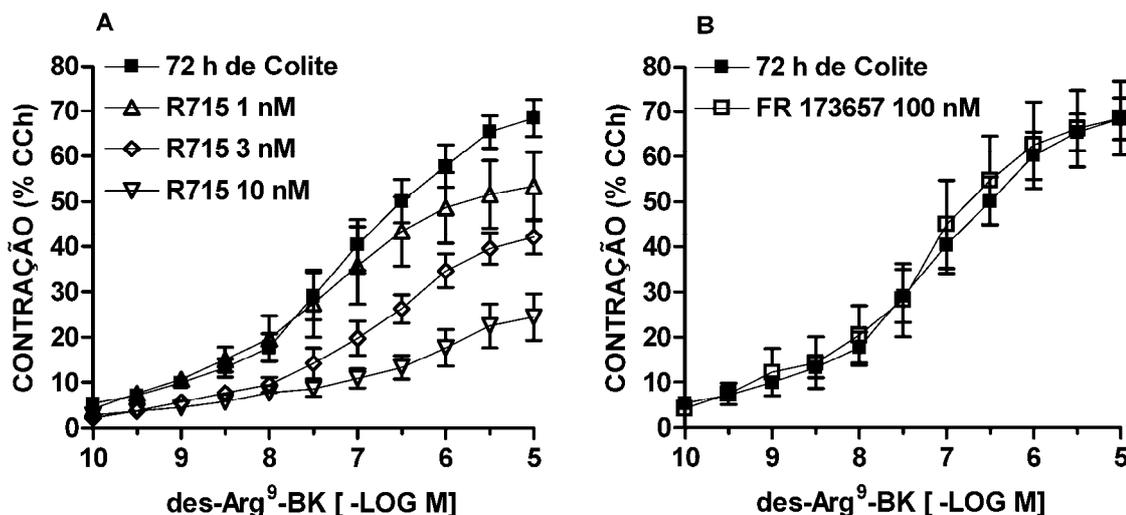


Figura 24. Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas sobre a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos após 72 h de indução da colite com TNBS, na ausência ou na presença de (A) R715 (1-10 nM) ou (B) FR173657 (100 nM) 60 min após a montagem das preparações. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 µM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6).

4.18. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel do cálcio extracelular e de canais de cálcio do tipo L

Com o objetivo de avaliar a possível participação do cálcio externo na resposta contrátil induzida pelo agonista do receptor B₁ des-Arg⁹-BK, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite na ausência ou na presença de cálcio. Para tal, após a obtenção da curva concentração-resposta cumulativa para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em solução de Krebs-Henseleit contendo cálcio, as preparações passaram a ser banhadas em solução de Krebs-Henseleit modificada, ausente de cálcio e contendo o quelante de cálcio etilenoglicol-bis-(β-amino-etil éster) (EGTA 1

mM). Os cólons permaneceram nesta nova solução nutritiva por 20 min, sendo a mesma renovada a cada 5 min. Nessas condições, a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) nos cólons isolados de camundongos com inflamação colônica por TNBS foi completamente abolida (**Figura 25 A**). Além disso, curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram obtidas 60 min após a montagem das preparações de cólons inflamados na ausência ou presença do bloqueador de canais de cálcio do tipo L, a nicardipina (1 μ M). Na **figura 25 B**, a nicardipina reduziu significativamente a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK; redução da R_{máx} de 45,05 \pm 8,03 %, quando comparada com a resposta controle.

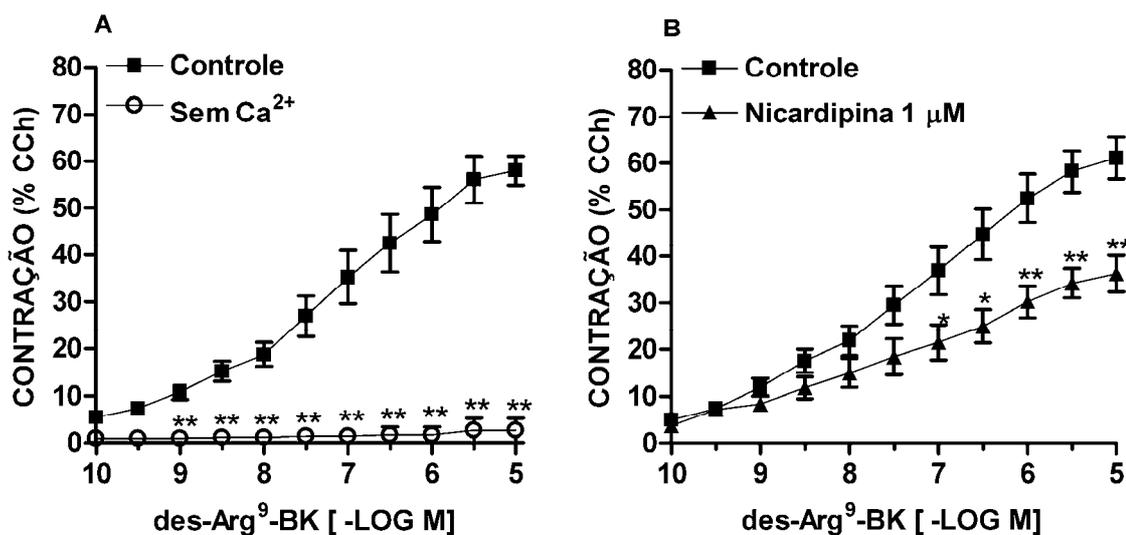


Figura 25. Papel do cálcio extracelular e canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. (A) Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos 72h após a indução da colite por TNBS realizadas em solução de Krebs-Henseleit com cálcio ou sem cálcio mais EGTA (1 mM). (B) Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons isolados de camundongos obtidas na ausência ou presença de nicardipina (1 μ M) 60 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μ M). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste "t" de Student não pareado).

4.19. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel da via do ácido araquidônico

O papel das fosfolipases de membrana, responsáveis pela liberação do ácido araquidônico na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK foram também avaliadas em cólons obtidos 72 horas após a indução da colite pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas na ausência ou presença do inibidor da fosfolipase A₂ (PLA₂) PACOCF3 (10 μM) ou do inibidor da fosfolipase C (PLC) U73122 (300 nM). Os dados da **figura 26** mostram redução significativa da R_{máx} para a des-Arg⁹-BK nos tecidos incubados com os inibidores PACOCF3 e U73122 (41,07 ± 9,24; 38,22 ± 7,63 %, respectivamente) quando comparados com os respectivos grupos controles.

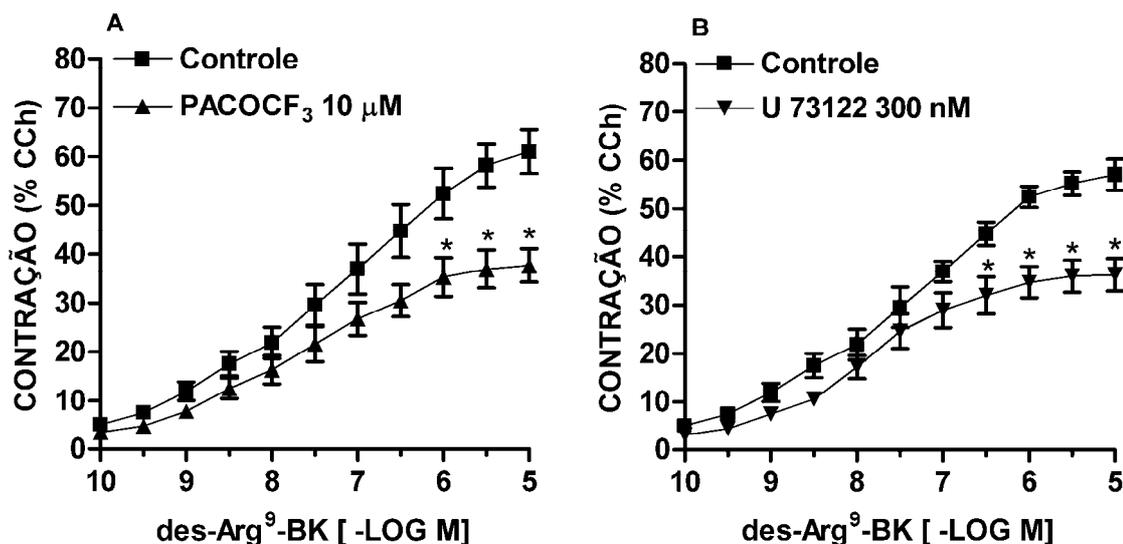


Figura 26. Efeito dos inibidores da fosfolipase na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS realizadas na ausência ou presença de (A) PACOFCF₃ (10 μM) ou (B) U73122 (300 nM) 60 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

Com o intuito de ampliar as evidências acerca do envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico sobre as respostas contráteis mediadas pelo receptor B₁, em cólons de camundongos, curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite com TNBS, na ausência ou na presença do inibidor não seletivo para as COXs indometacina (1 μM), do inibidor seletivo da COX-2 DFU (1 μM), do inibidor preferencial da COX-1 SC560 (1 μM) ou antagonista do receptor de leucotrieno D₄ MK571 (100 nM). Os resultados da **figura 27** demonstram que os inibidores das COXs Indometacina (**Figura 27 A**), DFU (**Figura 27 B**) e SC560 (**Figura 27 C**) foram capazes de reduzir significativamente a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em $28,61 \pm 8,47$;

36,10 ± 8,19 e 39,45 ± 4,06 %, respectivamente. Além disso, foi verificado que o MK571 (100 nM, **Figura 27 D**) não alterou significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK.

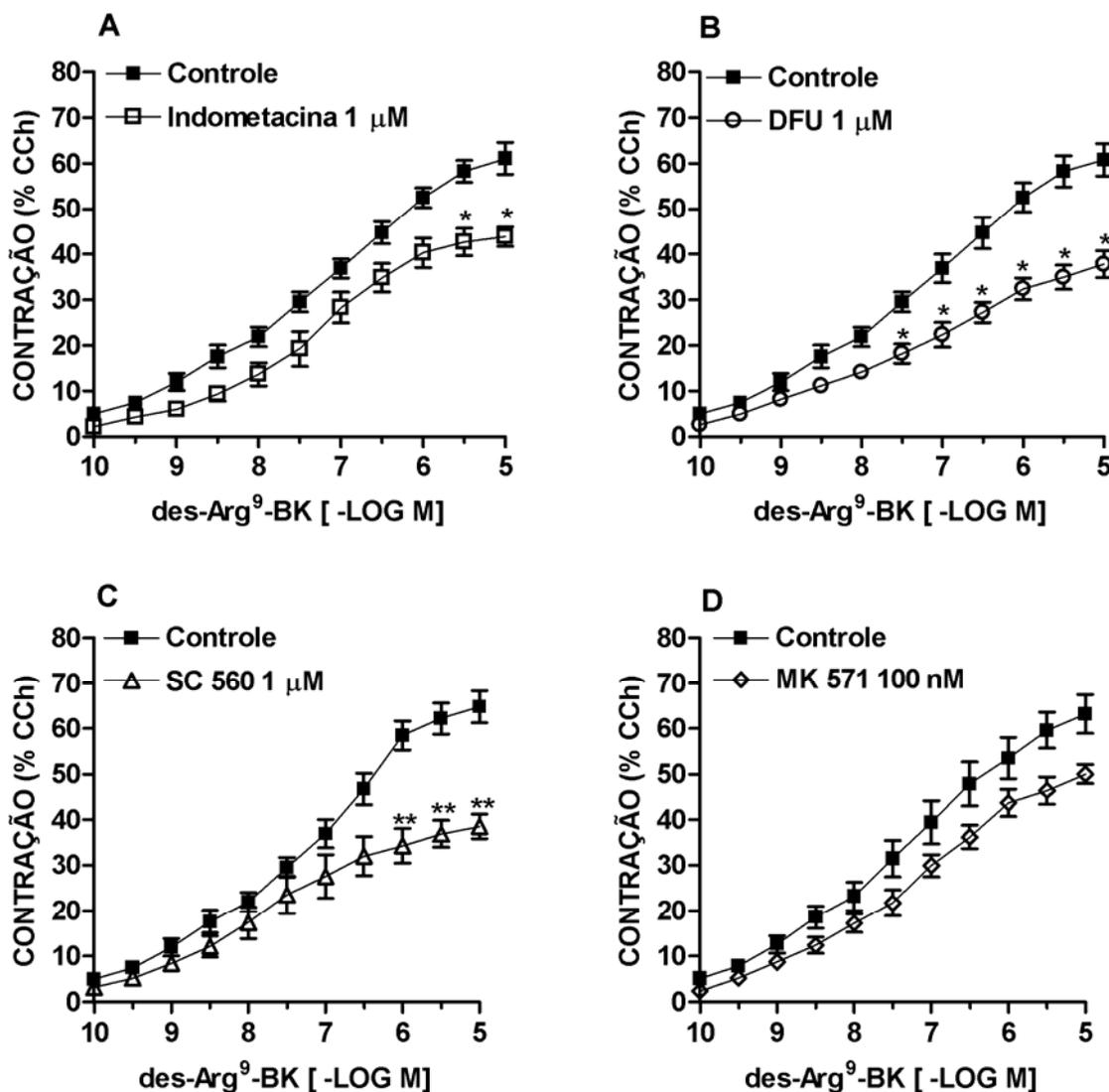


Figura 27. Efeito dos inibidores das ciclooxigenases e do antagonista do receptor de LTD₄ na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS realizadas na ausência ou presença de (A) indometacina (1 μM), (B) DFU (1 μM), (C) SC560 (1 μM) ou (D) MK571 (100 nM) 60 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbachol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.20. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel do óxido nítrico (NO)

A fim de avaliar a possível participação do NO na resposta contrátil mediada pelo receptor B₁, curvas concentração-resposta cumulativas para a des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) foram realizadas em cólons obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS na ausência ou na presença do inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) aminoguanidina (10 μM), do inibidor da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) L-NIO (10 μM) ou do inibidor seletivo da iNOS 1400W (10 μM). Os resultados ilustrados na **figura 28** indicam que os inibidores aminoguanidina (**Figura 28 A**), L-NIO (**Figura 28 B**) e 1400W (**Figura 28 C**) foram capazes de reduzir a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK de maneira significativa. As porcentagens de redução da R_{máx} foram 31,19 ± 5,89; 39,56 ± 6,47; 46,12 ± 8,01 %, respectivamente.

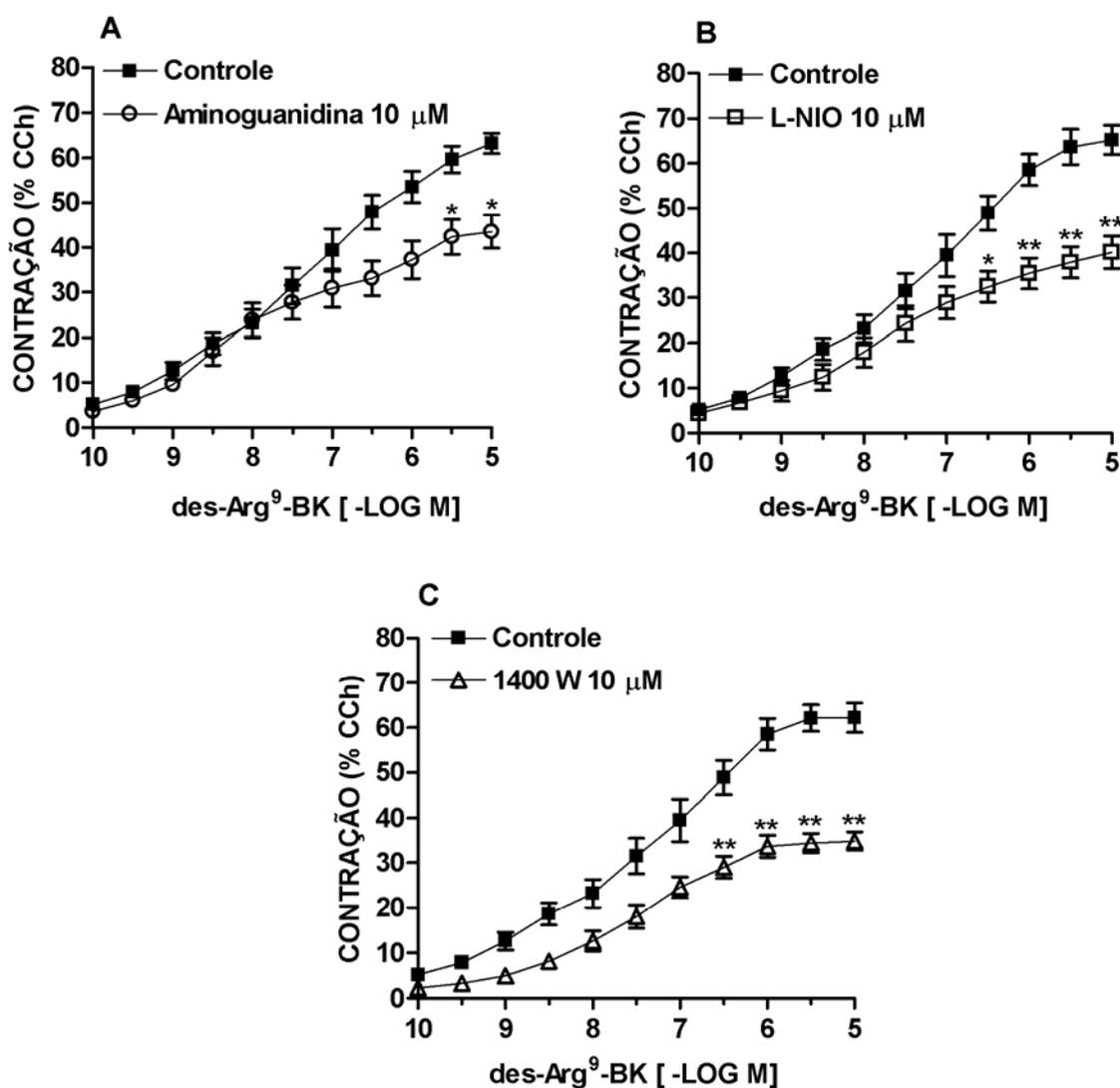


Figura 28. Efeito dos inibidores das NOS na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS realizadas na ausência ou presença de (A) aminoguanidina (10 μM), (B) L-NIO (10 μM) ou (C) 1400W (10 μM) 60 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

4.21. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil mediada pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS: papel das proteínas quinases

Visando analisar o possível envolvimento das proteínas quinases nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS; as preparações foram incubadas na ausência ou presença do inibidor da proteína quinase A (PKA) KT5720 (100 nM), do inibidor da proteína quinase C (PKC) GF109203X (1 μM), do inibidor seletivo da phosphoinositide 3-quinase γ (PI3K γ) AS605240 (10 μM) ou do inibidor da MEK1/2 PD98059 (10 μM). Os resultados da **figura 29** mostram redução significativa da R_{máx} induzida pela des-Arg⁹-BK na presença dos inibidores KT5720, GF109203X, AS605240 e PD98059 com inibições de 53,21 ± 6,87; 50,44 ± 1,69; 40,41 ± 9,93 e 49,44 ± 8,05 %, respectivamente.

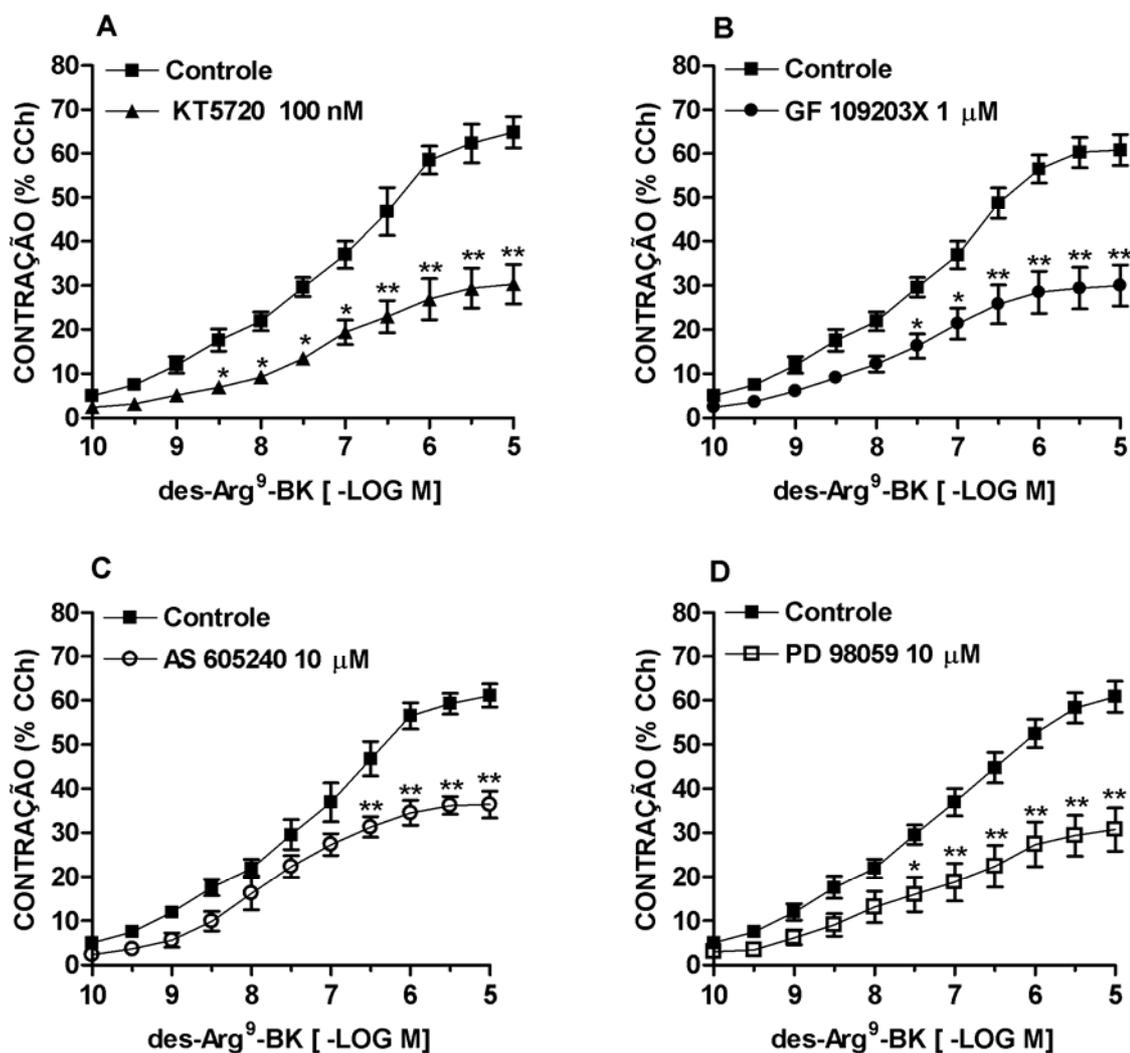


Figura 29. Efeito dos inibidores das proteínas quinases na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite induzida pelo TNBS. Curvas concentração-resposta cumulativas para des-Arg⁹-BK (0,1-10.000 nM) em cólons de camundongos obtidos 72 h após a indução da colite por TNBS, realizadas na ausência ou presença de (A) KT5720 (100 nM), (B) GF109203X (1 μM), (C) AS605240 (10 μM) ou (D) PD98059 (10 μM) 60 min após a montagem dos tecidos. Os resultados foram calculados em relação à contração máxima induzida pelo carbacol (CCh, 100 μM). Os valores estão expressos como a média ± e.p.m. (N = 6). *P<0,05 e **P<0,01 comparado ao grupo controle (teste “t” de Student não pareado).

5. DISCUSSÃO

5.1. Respostas contráteis induzidas pela BK e seus análogos em cólons de camundongos

As cininas representam um grupo de peptídeos endógenos, que agem localmente como hormônios, produzidos no plasma ou em tecidos periféricos em resposta a estímulos fisiológicos ou traumáticos. As cininas são produzidas a partir de precursores endógenos denominados de cininogênios os quais sofrem a ação das enzimas caliceínas. As cininas exercem múltiplas ações em diferentes tecidos, como contração e relaxamento da musculatura lisa, controle da pressão sanguínea, dilatação venular, dor, hiperalgesia e no processo inflamatório (Marceau e Regoli, 2004). As ações exercidas pelas cininas são mediadas pela ativação de dois receptores, chamados de B₁ e B₂. Os receptores do tipo B₂ são expressos constitutivamente em vários tipos celulares e estão amplamente distribuídos no SNC e no SNP. Esses receptores apresentam alta afinidade pela BK e pela calidina e são responsáveis por mediar muitas das ações fisiológicas das cininas. Entretanto, os receptores do tipo B₁, demonstram não serem constitutivos, com poucas exceções, havendo a necessidade de indução; os receptores B₁ possuem alta afinidade por metabólitos da BK como a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina (Marceau e Bachvarov, 1998; Marceau e Regoli, 2004).

A atividade enzimática das caliceínas tem sido descrita no trato gastrointestinal de ratos, gatos e seres humanos (Clements, 1989). No cólon, tem sido referido, que essas enzimas estão localizadas em células goblet, e que possuem origem pancreática e sub-maxilar (Schachter *et al.*, 1983, 1986; Skagen e

Andersen, 1986). Alguns estudos têm demonstrado que as cininas modulam diversas ações fisiológicas no intestino como a dilatação de veias e arteríolas - interferindo assim no fluxo sanguíneo, na secreção de muco e eletrólitos, na motilidade, na permeabilidade intestinal, nas respostas dolorosas viscerais e na inflamação (Cuthbert e Margolius, 1982; Schachter *et al.*, 1983; Cuthbert e MacVinish, 1986; Clements, 1989; Gaginella e Kachur, 1989). No entanto, são escassos os trabalhos dedicados a caracterizar os mecanismos farmacológicos envolvidos nas respostas mediadas pelas cininas no tecido colônico.

Os resultados do presente estudo demonstram que a BK e outros agonistas do receptor B_2 , induzem resposta contrátil concentração-dependente em preparações de cólons de camundongos, sem que ocorra, o fenômeno da dessensibilização observado em células do endotélio vascular (Smith *et al.*, 1995) e células vasculares do músculo liso (Mathis *et al.*, 1996). Essa resposta contrátil do cólon de camundongos vem novamente confirmar o caráter constitutivo dos receptores B_2 amplamente mencionado nos estudos das cininas (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola *et al.*, 1992; Prado *et al.*, 2001). Contudo, em relação à ordem de potências relativas para os agonistas seletivos do receptor B_2 , nessa preparação, os agonistas analisados apresentaram a seguinte ordem de $R_{máx}$: BK > Lys-BK > Hyp³-BK > Tyr⁸-BK > Met-Lys-BK > des-Arg⁹-BK. Dessa forma, os resultados apresentados estão de acordo com a literatura e demonstram que o receptor B_2 é o principal responsável por mediar respostas contráteis para as cininas em diversos órgãos de diferentes espécies animais em estados não inflamatórios (Bhoola *et al.*, 1992). Por outro lado, o agonista seletivo dos receptores B_1 a des-Arg⁹-BK, nessas condições, não foi capaz de promover resposta contrátil expressiva no cólon,

reforçando a idéia da ausência constitutiva de receptores do tipo B₁ e da sua necessidade de indução.

Investigou-se a seguir, com o emprego de antagonistas seletivos, o perfil farmacológico dos receptores B₂ em cólons de camundongos. Para tal, foram utilizados antagonistas peptídicos e não peptídicos seletivos para o receptor B₂, incluindo o Hoe 140 e o FR 173657, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que ambos os antagonistas apresentaram um perfil de ação de maneira dose-dependente, contudo, considerando que os antagonistas causaram redução significativa na R_{máx} o antagonismo observado não pareceu ser do tipo não-competitivo, mas sim, do tipo competitivo irreversível, em relação à resposta contrátil induzida pela BK (para revisão ver: Vauquelin e Szczuka, 2007). Entretanto, foi demonstrado também que o antagonista seletivo dos receptores B₁ a des-Arg⁹-Leu⁸-BK, não foi capaz de alterar a resposta contrátil induzida pela BK. Esses resultados sugerem novamente uma maior participação de receptores do tipo B₂ do que do tipo B₁ nessas condições em cólons de camundongos. Ademais, alguns dados da literatura reportam que o Hoe 140 e o FR 173657 podem apresentar antagonismo do tipo competitivo ou não-competitivo dependendo do tecido e da condição experimental estudada (Griesbacher e Lembeck, 1992; Griesbacher *et al.*, 1997).

Estudos bioquímicos e farmacológicos têm descrito que apesar das diferenças entre os receptores B₁ e B₂ das cininas, na maioria das vezes, as vias de transdução de sinal desencadeadas por ambos os receptores parecem ser semelhantes (Prado *et al.*, 2002; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Os receptores para as cininas pertencem à família de receptores acoplados a proteína G (Gai e Gαq), podendo sua ativação estar relacionada à estimulação direta ou indireta de diferentes vias de sinalização intracelular. Algumas dessas vias incluem: fosfolipase

C, fosfolipase D, aumento de cálcio intracelular, ativação de isoformas específicas da proteína quinase C, estimulação de canais de potássio, transporte de íons cloreto, ativação da adenilato ciclase, formação de óxido nítrico, aumento expressivo dos níveis de prostanóides e a ativação de MAPKs (Schanstra *et al.*, 1999; Liebmann e Böhmer, 2000; Liebman 2001; Leeb-Lumsberg *et al.*, 2005).

Trabalhos como o de Bascands *et al.*, (1994), têm demonstrado a importante participação do cálcio nas respostas mediadas pelas cininas, indicando que a ativação de células mesangiais pela BK resulta no aumento de inositol 1,4,5-trifosfato e de cálcio citosólico livre. Outros trabalhos realizados em preparações isoladas como em íleo de cobaias e íris de porco (Calixto e Medeiros, 1991; Medeiros e Calixto, 1993; El Sayah e Calixto 2003b), confirmam que a contração induzida pela BK é dependente do influxo de cálcio do meio extracelular. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que em preparações obtidas de cólons de camundongos a contração induzida pela BK também é dependente do influxo de cálcio extracelular uma vez que é praticamente abolida em preparações banhadas em meio nutritivo livre de cálcio e contendo o quelante de cálcio EGTA.

No presente trabalho investigou-se alguns subtipos de canais de cálcio dependentes de voltagem envolvidos na resposta contrátil induzida pela BK em cólons de camundongos. Inicialmente, o papel dos canais de cálcio do tipo L foi observado com o uso do bloqueador seletivo a nicardipina. Os resultados demonstraram que a incubação das preparações com este bloqueador resulta em uma significativa redução da resposta contrátil à BK, confirmando assim a importância de canais de cálcio tipo L nessa resposta contrátil. De fato, os canais de cálcio do tipo L estão amplamente distribuídos na musculatura lisa intestinal e estão

envolvidos na motilidade e contratilidade do cólon (Kinoshita *et al.*, 2003). No presente estudo investigou-se ainda a participação dos canais de cálcio do tipo N, envolvidos na liberação de neurotransmissores tanto no sistema nervoso central como no periférico (McNaughton e Randall, 1997). Os resultados obtidos nas preparações de cólons incubadas com o bloqueador seletivo ω -conotoxina GVIA evidenciaram a participação desses canais na resposta contrátil à BK, uma vez que a contratilidade foi reduzida significativamente na presença deste bloqueador. Resultados semelhantes acerca do envolvimento de ambos os canais de cálcio na contração induzida pela BK foram descritos em preparações obtidas de estômago de rato e íris de porco (Cabrini *et al.*, 1996; El Sayah e Calixto, 2003b).

Alguns trabalhos da literatura têm descrito que, no intestino, o neurotransmissor excitatório acetilcolina é capaz de evocar respostas contráteis, aumentar a amplitude dessas respostas e controlar a motilidade (para revisão ver: Lecci *et al.*, 2002). A acetilcolina produz contrações no músculo liso visceral através da estimulação de cinco subtipos de receptores conhecidos como M₁-M₅. Entretanto, o músculo liso visceral colônico expressa predominantemente os subtipos M₂ e M₃ (Eglen, 2001). A estimulação desses receptores está associada à ativação de fosfolipase C_β que leva à liberação de Ca²⁺ intracelular via IP₃ e a ativação da proteína quinase C (α, β ou ε). A inibição dessas enzimas reduz as contrações induzidas pela acetilcolina no tecido colônico normal (Eglen, 2001; Ali e Sarna, 2002). Além disso, experimentos utilizando cólon de cobaia isolado demonstraram que a atropina e a tetrodotoxina (TTX) reduzem as ondas rítmicas da musculatura longitudinal, sugerindo um importante papel do sistema colinérgico e de canais sódio voltagem dependentes sensíveis à TTX na contratilidade muscular espontânea do tecido colônico (Spencer *et al.*, 2002). Desse modo, investigou-se no presente

estudo a possível participação do sistema colinérgico e de canais de sódio dependentes de voltagem sensíveis à TTX nas respostas contráteis induzidas pela BK em cólons de camundongos. Para tal, utilizou-se o antagonista muscarínico atropina, capaz de bloquear de forma não seletiva os receptores muscarínicos, ou o bloqueador de canal de sódio TTX, uma toxina conhecida por inibir, de maneira abrangente, a liberação de neurotransmissores. Os resultados obtidos em cólons de camundongos demonstram que em ambos os estudos, houve significativa redução da resposta contrátil induzida pela BK, confirmando a importante participação desses sistemas nessa resposta contrátil.

Desde o advento da BK sintética, na década de sessenta, têm sido sugerida a participação das cininas na liberação de mediadores envolvidos nos processos inflamatórios e de dolorosos em diversos tipos teciduais (Regoli e Barabé 1980; Calixto *et al.*, 2000, 2004). Ademais, evidências experimentais sugerem o envolvimento dos produtos das enzimas ciclooxigenases e lipooxigenases nas ações causadas pelas cininas no trato gastrointestinal e em preparações de cólons de coelhos, cobaias e ratos (Musch *et al.*, 1982; Hall e Morton 1997), sendo escassos os estudos em cólons de camundongos. Parte dos resultados obtidos no presente estudo indicam que a contração induzida pela BK em cólons de camundongos foi significativamente reduzida na presença do antiinflamatório não esteroideal, indometacina; do inibidor seletivo da COX-2, rofecoxibe; do inibidor preferencial da COX-1, SC560; ou do inibidor do receptor de leucotrieno D₄, o MK571, confirmando o envolvimento da produção de prostanóides e do leucotrieno D₄ na resposta contrátil à BK em cólons de camundongos.

A fisiologia do sistema gastrointestinal, bem como sua regulação pelo sistema nervoso entérico (SNE), depende grandemente da modulação promovida por

compostos neuroefetores, sendo alguns conhecidos como neuropeptídeos incluindo a substância P, a neurocinina A, a neurocinina B e o CGRP (Holzer, 1998; Lecci *et al.*, 2002). Esses neuropeptídeos participam do controle da motilidade gastrointestinal, da secreção de muco e eletrólitos, do controle do fluxo sanguíneo, bem como da homeostasia tecidual intestinal. Além disso, tem sido descrito o importante papel exercido pelas neurocininas no controle da motilidade intestinal tanto em humanos como em animais, pois antagonistas do receptor NK₁ levam ao desencadeamento de diarreia em humanos, por bloquearem a função neuroefetora da SP no plexo mientérico do SNE (Goldstein *et al.*, 2001; Campos, *et al.*, 2001). De maneira interessante, tem sido observado que a inibição concomitante dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃ em cobaias torna mais lento o peristaltismo colônico (Tonini *et al.*, 2001). O presente estudo amplia os dados da literatura e confirma a participação das neurocininas e do CGRP na resposta contrátil induzida pela BK no cólon de camundongos, uma vez que o antagonista seletivo do receptor NK₁ R116301, o antagonista seletivo do receptor NK₃ SR142801 ou o antagonista do receptor para o CGRP, o fragmento CGRP₍₈₋₃₇₎, causaram redução dessa resposta.

A liberação de neuropeptídeos nos terminais de neurônios sensoriais é regulada por receptores expressos na membrana destas células, em especial pelos receptores TRPV1 (Clapham, 2003), canais de cátion não seletivos, capazes de integrar informações sensoriais, químicas, físicas e inflamatórias (Jordt *et al.*, 2003; Myers e Julius 2007). Evidências têm apontado um papel importante para esse receptor no trato gastrointestinal, em especial na constipação crônica, na IBD e na síndrome do intestino irritável (IBS) (Yiangou *et al.*, 2001; Fujino *et al.*, 2006; Hicks, 2006; Storr, 2007). A redução da resposta contrátil à BK em preparações de cólons de camundongos observada na presença dos antagonistas vanilóides capsazepina

ou SB366791 sugere uma importante interação entre as cininas e o sistema vanilóide, corroborando com observações anteriores realizadas em outras preparações como a íris isolada de porco (El Sayah e Calixto, 2003b).

Em seguida, após o estudo de alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela BK mediadas pelos receptores do tipo B₂, foi avaliada a possível indução dos receptores do tipo B₁ em preparações de cólon. Como descrito na parte introdutória desse trabalho, os receptores B₁ para as cininas são raramente expressos de modo constitutivo, mas sua síntese pode ser estimulada após trauma tecidual ou durante processos inflamatórios (para revisão ver: Marceau e Bachvarov 1998; Calixto *et al.*, 2000, 2004). Contudo, em alguns músculos lisos, os receptores B₁ parecem ocorrer constitutivamente, como por exemplo, no duodeno isolado de rato (Boschov *et al.*, 1984), na veia porta isolada de rato (Campos e Calixto, 1994), no ducto deferente isolado de camundongo (Maas *et al.*, 1995) e no fundo de estômago de ratos (Cabrini *et al.*, 1996). Uma característica bastante interessante acerca das respostas mediadas pela ativação dos receptores B₁ é que elas podem ser induzidas após o trauma tecidual, após longos períodos de incubação *in vitro*, ou através de procedimentos farmacológicos, como a adição de alguns agentes nocivos, como LPS, acetato miristato de forbol, bem como alguns fatores de crescimento epidermal, dentre outros (Hall e Morton, 1997; Campos e Calixto, 1994; Marceau e Bachvarov, 1998).

Para avaliar a indução *in vitro* do receptor B₁ em cólons de camundongos, o agonista seletivo para os receptores B₁ des-Arg⁹-BK (1 μM) foi adicionado às preparações em diferentes intervalos de tempo após a montagem. Dessa forma, foi possível constatar um aumento tempo-dependente da resposta contrátil mediada pelo agonista do receptor B₁ a des-Arg⁹-BK nesta preparação. A resposta contrátil

observada foi máxima entre os tempos de 6-8 h, não havendo diferenças significativas entre eles. O aparecimento de respostas contráteis à des-Arg⁹-BK em diferentes tempos após a montagem dos tecidos na ausência de estímulos específicos foi observada também em preparações de artéria mesentérica de coelho (Deblois e Marceau, 1987), aorta de coelho (Audet *et al.*, 1994), de veia umbilical humana (Sardi *et al.*, 1997), artéria mesentérica de coelho (Deblois e Marceau, 1987) e na veia porta de rato (Medeiros *et al.*, 2004).

Com o objetivo de verificar o possível envolvimento do sistema cininérgico na resposta à des-Arg⁹-BK em preparações de cólons de camundongo após 6 h de montagem, as mesmas foram testadas na ausência e na presença do antagonista seletivo para o receptor B₁ o R715 ou do antagonista seletivo para o receptor B₂ o FR173657. Os resultados obtidos na presença do antagonista seletivo para o receptor B₁ demonstram uma redução da resposta contrátil (associado a um achatamento das curvas), caracterizando assim um antagonismo do tipo competitivo irreversível. Por outro lado, o antagonista do receptor B₂ não interferiu de forma significativa com a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK no cólon isolado de camundongo, indicando a predominância de uma resposta contrátil evocada pelos receptores do tipo B₁. Esse resultado condiz com o perfil farmacológico evidenciado em outros tecidos como a íris isolada de porco (El Sayah *et al.*, 2006). Os resultados obtidos na presença do R715 foram confirmados com o uso de outros antagonistas seletivos para o receptor B₁, como a des-Arg⁹-Leu⁸-BK, considerada membro da primeira geração de antagonistas, além do SSR 240612 e do composto Benzodiazepínico-1 (BZ-1), considerados membros da quarta geração de antagonistas (Campos *et al.*, 2006). Como esperado, os antagonistas testados em

preparações de cólons de camundongos foram capazes de promover significativa redução na resposta contrátil à des-Arg⁹-BK.

Analisados em conjunto, este primeiro bloco de resultados demonstra que a resposta contrátil induzida pela BK e análogos, em preparações de cólons de camundongos, é mediada pela ativação dos receptores B₂. Em relação à caracterização farmacológica, ambos os antagonistas seletivos para o receptor B₂ estudados, o Hoe 140 e o FR 173657, foram capazes de reduzir as respostas contráteis à BK, caracterizando um antagonismo do tipo competitivo irreversível. Ademais, a resposta contrátil induzidas pela BK em preparações colônicas, demonstrou ser dependente do influxo de cálcio do meio extracelular, de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L e N, do sistema colinérgico, de canais de sódio sensíveis à TTX, de metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, da participação de neuropeptídeos como SP, neurocinina B e o CGRP e finalmente demonstrou ser mediadas pela interação com receptores do tipo TRPV1. No entanto, diferentemente da resposta constitutiva mediada pelos receptores B₂, a resposta contrátil evidenciada em cólons de camundongos pelos receptores B₁ *in vitro*, demonstrou sofrer um aumento tempo-dependente. A caracterização farmacológica da resposta contrátil induzida para o agonista B₁ foi realizada inicialmente com o antagonista R 715, que causou redução da resposta contrátil evidenciando novamente um antagonismo do tipo competitivo irreversível. Além disso, na utilização de outros antagonistas B₁ como a des-Arg⁹-Leu⁸-BK, o SSR 240612 e o composto Benzodiazepínico-1, em preparações de cólons após a indução *in vitro* do receptor B₁, novamente constatou-se redução da resposta contrátil.

5.2. Avaliação das cininas e seus receptores B₁ e B₂ em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS

A IBD é clinicamente descrita pela doença de Crohn e pela colite ulcerativa, que são patologias caracterizadas por inflamação crônica do trato gastrointestinal. A doença de Crohn pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal e geralmente está associada com lesões na parede do intestino, enquanto que, na colite ulcerativa a inflamação é restrita ao cólon e ao reto, e é caracterizada por inflamação em camadas mais superficiais e pela presença de ulcerações ou abscessos. A etiologia da IBD ainda não está totalmente esclarecida e parece haver a contribuição de fatores como infecções bacterianas persistentes e regulação inapropriada das respostas do sistema imune, com o envolvimento de diversos mediadores inflamatórios (Podolsky, 2002; Bouma e Strober 2003; Danese e Fiocchi, 2006; Baumgart e Carding, 2007).

O sistema calicreína-cininas faz parte do sistema de defesa humoral e participa ativamente de respostas inflamatórias (Colman, 1999). Nos últimos anos tem sido proposto que as cininas estão envolvidas nas respostas inflamatórias e nos sintomas da IBD, uma vez que estes peptídeos são capazes de facilitar a abertura das junções epiteliais das células intestinais - aumentando assim a permeabilidade capilar, estimular terminações nervosas sensoriais causando dor, além de estimular a síntese de eicosanóides e óxido nítrico. Ademais, os receptores para as cininas, que colaboram grandemente para a inicialização e perpetuação dessas respostas, estão presentes no epitélio intestinal modulando as respostas inflamatórias tanto no íleo como no cólon (Chen *et al.*, 1995). Recentemente, Stadnicki *et al.*, (2005) descreveram alterações nos níveis de proteína e RNAm dos receptores B₁ e B₂ em

pacientes com IBD, quando comparados com os respectivos controles, e dessa forma sugeriram que os receptores para as cininas poderiam contribuir para a gênese desta patologia. Entretanto, ainda existem poucos estudos correlacionando as cininas, seus receptores e a IBD.

Como descrito na seção anterior, os receptores para as cininas principalmente o receptor B₁ pode ser induzido em preparações isoladas através do dano tecidual decorrente da montagem *in vitro* (por exemplo, montagem da veia porta de ratos; Medeiros *et al.*, 2004), ou por diversos agentes nocivos como o LPS (por exemplo, incubação de LPS em preparações de íris de porco (El Sayah *et al.*, 2006). Além disso, têm sido referido, que os receptores B₁ podem ser induzidos *in vivo*, na ocorrência de infecções, lesões ou ainda em doenças inflamatórias crônicas. Dados da literatura demonstram a indução *in vivo* do receptor B₁ após o tratamento sistêmico de macacos com LPS e no tratamento local na pata de ratos (Deblois e Horlick, 2001; Passos *et al.*, 2004), após injeção intradermal de tripomastigotas (que irão causar a infecção por *Trypanosoma cruzi*) em camundongos (Todorov *et al.*, 2003), em modelos de isquemia e reperfusão cardíaca realizada em coelhos e camundongos, ou na isquemia pancreática realizada em ratos (Mazenot *et al.*, 2001; Lagneux *et al.*, 2002; Kuebler *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004), em modelos de asma brônquica induzida por ovoalbumina em ratos e camundongos (Huang *et al.*, 1999; Landgraf *et al.*, 2003), no modelo de diabetes por estreptozotocina em ratos (Campos *et al.*, 2002; Vianna *et al.*, 2003) e em alguns tipos de câncer como o de próstata (Taub *et al.*, 2003).

Nesse sentido, após a padronização da colite ulcerativa por TNBS em camundongos, passou-se a estudar, com o auxílio de técnicas farmacológicas,

bioquímicas e de biologia molecular o envolvimento das cininas e seus receptores na colite ulcerativa.

Na indução da colite por TNBS, observou-se aumento expressivo, tempo-dependente nas respostas contráteis tanto para a BK como para a des-Arg⁹-BK em cólons obtidos em diferentes intervalos de tempo após a administração do TNBS. A resposta máxima causada por ambos os peptídeos foi observada em cólons obtidos 72 h após a indução da colite. Esse aumento dos receptores B₁ e B₂ em tecidos colônicos de camundongos com colite experimental está de acordo com estudos anteriores realizados em ratos (Stadnicki *et al.*, 1998) e em humanos (Devani *et al.*, 2005; Stadnicki *et al.*, 2003, 2005).

Com o intuito de confirmar o aumento da expressão dos receptores para as cininas na colite experimental induzida por TNBS, realizaram-se experimentos de união específica (*binding* de saturação), utilizando-se os radioligantes [³H]-BK, ligante do receptor B₂ ou [³H]-des-Arg¹⁰-calidina, ligante do receptor B₁, em tecidos colônicos obtidos de camundongos controle (sem colite) ou com colite induzida por TNBS após o tempo de 72 h. Os resultados obtidos em ambos os experimentos com os radioligantes [³H]-BK e [³H]-des-Arg¹⁰-calidina demonstraram um aumento significativo no $B_{máx}$, sem alteração significativa do K_d . Assim, foi constatado que na colite induzida por TNBS em cólons de camundongos ocorre aumento na densidade tanto dos receptores B₁ como B₂ sem, no entanto, causar alteração significativa da afinidade dos receptores pelo ligante. Resultados semelhantes foram observados na bexiga urinária de rato após a indução de cistite por ciclofosfamida (Lecci *et al.*, 1999), onde ocorre um aumento na densidade dos receptores B₁ e B₂ na cistite em comparação com os respectivos tecidos controles. Ademais, aparentemente, o resultado de união específica obtido em cólons de camundongos, parece ser, o

segundo relato da literatura que avalia, através dessa técnica, os receptores do tipo B₁ em tecidos inflamados.

Além da determinação da densidade dos receptores cininérgicos em tecidos com o uso de técnicas de ensaio de união específica, técnicas de biologia molecular que permitem avaliar a expressão do RNAm para esses receptores têm contribuído expressivamente para o melhor entendimento da participação desses receptores nos processos patofisiológicos (Luccarini *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2004; Marceau e Regoli, 2004). Na IBD, Stadnicki *et al.*, (2005) demonstraram aumento na expressão do RNAm para ambos os receptores B₁ e B₂ em enterócitos de intestino humano, bem como aumento significativo na expressão dos receptores B₁ na região apical desses enterócitos (por imunohistoquímica). Os resultados obtidos no presente estudo em cólons de camundongos em diferentes tempos após a indução de colite por TNBS, estão de acordo com aqueles descritos por Stadnicki *et al.*, (2005), uma vez que também na colite experimental ocorre um aumento significativo da expressão do RNAm para os receptores B₁ e B₂. Esse aumento do RNAm para ambos os receptores B₁ e B₂, caracterizou-se por ser variável para o receptor B₂ e por apresentar um pico de expressão até as primeiras 24 h, mas mantendo-se elevado até 96 h para o receptor B₁. Desse modo, pode-se inferir que a expressão aumentada do RNAm para os receptores cininérgicos na colite experimental induzida em camundongos, resulta em aumento do número destes receptores na membrana celular observado nos estudos funcionais e de união específica.

Após os estudos de clonagem e seqüenciamento dos receptores B₁ e B₂, tornou-se possível o desenvolvimento de linhagens de camundongos com deleção gênica para esses receptores. Em animais com deleção gênica para o receptor B₂ foi possível comprovar a participação desse receptor nos processos de inflamação, dor,

contração e relaxamento da musculatura lisa e na modulação da pressão arterial (Borkowski *et al.*, 1995; Boyce *et al.*, 1996). Já em animais com deleção gênica para o receptor B₁ foi demonstrada a importância desses receptores em respostas dolorosas (dor neuropática) e inflamatórias, na apoptose de neutrófilos e na hipotensão (Pesquero *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005). Finalmente, em camundongos com deleção gênica para ambos os receptores B₁ e B₂ (duplo nocaute), foi possível constatar que esses animais são férteis e não possuem anormalidades cardíacas, além disso, apresentam proteção contra a hipotensão induzida pelo LPS no choque endotóxico (Cayla *et al.*, 2007).

Considerando os animais com deleção gênica para os receptores cininérgicos como importantes ferramentas para o estudo acerca do papel destes receptores, passou-se a investigar com o uso destes animais a contribuição dos receptores B₁ e B₂ na indução da colite ulcerativa por TNBS e na migração celular em cólons inflamados. Os resultados obtidos demonstram claramente uma redução marcante no dano tecidual nos cólons dos animais com deleção gênica para os receptores B₁ e B₂, sendo essa resposta mais expressiva nos animais com deleção gênica para o receptor B₁, quando comparada com os animais controles (animais C57/BL6 com colite). Vários trabalhos têm demonstrado a capacidade das cininas de promover a migração celular em processos inflamatórios (Hall e Morton, 1997; Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto *et al.*, 2000; Passos *et al.*, 2004); sendo assim, quanto à migração celular, avaliada indiretamente pela atividade da MPO em animais com deleção gênica para os receptores B₁ e B₂, observou-se uma significativa redução da atividade dessa enzima em cólons inflamados obtidos de animais com deleção gênica para o receptor B₁, comparado com os animais controle (animais C57/BL6 com colite). De maneira interessante, não foi observada redução significativa na

migração celular em camundongos com deleção gênica para o receptor B₂, sugerindo dessa forma, que nos animais nocaute para o receptor B₂, a migração celular está sendo modulada por outros fatores. Tais resultados obtidos concordam com os dados da literatura (Devani *et al.*, 2002, 2005; Isordia-Salas *et al.*, 2002; Stadnicki *et al.*, 1998, 2003, 2005), que sugerem uma importante participação dos receptores B₁ e B₂ na gênese e na manutenção da UC e da CD, bem como, a direta participação principalmente dos receptores B₁ nas respostas inflamatórias do cólon.

Assim, analisados em conjunto, este segundo bloco de resultados evidenciou o aumento da resposta contrátil induzida tanto pela BK quanto pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite por TNBS, sendo essa resposta tempo-dependente, alcançando valores máximos em cólons obtidos 72 h após a indução da colite. Além disso, foi possível verificar aumento na densidade dos receptores para as cininas em cólons de camundongos obtidos após 72 h de colite, bem como aumento nos níveis do RNAm para ambos os receptores B₁ e B₂ na colite. Finalmente, a partir dos resultados obtidos em animais com deleção gênica para os receptores B₁ e B₂ é possível sugerir com maior clareza a participação destes receptores, em especial dos receptores B₁, na gênese da colite ulcerativa.

5.3. Estudo de alguns dos mecanismos envolvidos na indução do receptor B₁ em cólons de camundongos com colite induzida por TNBS

Dados da literatura têm demonstrado aumento da expressão dos receptores B₁ *in vivo* após a indução de estresse térmico em ratos (Lagneux e Ribuot, 1997), na administração endovenosa de IL-1 β em camundongos (McLean *et al.*, 2000), ou ainda em suínos e macacos, após o tratamento com LPS (Siebeck *et al.*, 1998;

Deblois e Horlick, 2001). Campos *et al.*, (1998) demonstraram que a injeção intradérmica de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF α produziu rápido aumento do edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em ratos. Esse mesmo efeito também pode ser observado em ratos e camundongos pré-tratados com LPS ou com o fator de agregação plaquetária (PAF) (Campos *et al.*, 1998, 2002; Fernandes *et al.*, 2003; Passos *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005). Além disso, o aumento dos receptores B₁ também foi descrito em modelos crônicos como o de diabetes do tipo I induzida pelo tratamento com estreptozotocina (Cloutier e Couture, 2000; Campos *et al.*, 2001).

Evidências acerca da indução dos receptores B₁, demonstram que a expressão desses receptores está associada ao aumento do seu RNAm e de sua proteína, sendo controlada principalmente pela produção de citocinas e de fatores preferencialmente produzidos durante o trauma ou estresse tecidual (Larrivéé *et al.*, 1998; Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; 2004). Um dado interessante, é que os receptores B₁ parecem ser induzidos sobre as mesmas condições descritas para a indução de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e iNOS; nesse mesmo sentido, os estímulos e vias de sinalização celular (transducionais e pós-transducionais) que são capazes de aumentar a expressão do receptor B₁ parecem ser os mesmos que regulam as enzimas COX-2 e iNOS (Dixon, 2004). No entanto, tem sido amplamente demonstrado que compostos farmacológicos que modulam a síntese protéica são capazes de inibir a expressão dos receptores B₁ em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (Marceau *et al.*, 1998; Sardi *et al.*, 2000; Calixto *et al.*, 2004).

Desse modo, a fim de melhor caracterizar alguns dos mecanismos envolvidos na indução dos receptores B₁ em cólons de camundongos, animais submetidos ao

protocolo de indução da colite experimental por TNBS foram tratados desde o jejum com o glicocorticóide dexametasona ou com o inibidor de síntese protéica cicloheximida. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK *in vitro*, indicando que a síntese *de novo* é um evento importante para o aumento dos receptores B₁ na colite. Ademais, a administração *in vivo* da dexametasona e da cicloheximida resultou em redução significativa no dano tecidual observado no tecido colônico. De maneira interessante, quando as mesmas drogas (dexametasona e cicloheximida) foram incubadas *in vitro* em preparações de cólons obtidos após 72 h de indução da colite, não foram observadas alterações significativas nas respostas contráteis à des-Arg⁹-BK, sugerindo que os receptores B₁ estariam nesta situação já previamente induzidos. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com aqueles observados por Ni *et al.*, (1998) obtidos em células da musculatura lisa vascular de rato, onde o tratamento com a dexametasona foi capaz de inibir significativamente a indução do receptor B₁ por atuar diretamente na transcrição gênica do receptor. Nesse mesmo sentido, o trabalho de Lecci *et al.*, (1999) demonstrou que a administração *in vivo* da dexametasona foi capaz de reduzir significativamente a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK em preparações de bexiga urinária obtidas tanto de ratos controle quanto de ratos com cistite. Complementarmente, Cabrini *et al.*, (2001) demonstraram que a retirada cirúrgica da glândula adrenal ou a lesão química pelo tratamento com mitotane (agente adrenocorticolítico), induz aumento da expressão dos receptores B₁, sugerindo dessa forma que os glicocorticóides endógenos controlam as respostas inflamatórias bem como a expressão dos receptores B₁. Quanto à cicloheximida, trabalhos como o de Campos e Calixto, (1994), Cabrini e Calixto,

(1997) e El Sayah *et al.*, (2006) demonstraram que a incubação de preparações de veia porta de rato, vesícula biliar ou da íris de porco na presença deste inibidor resultou em uma significativa redução das respostas contráteis à des-Arg⁹-BK, indicando que a da síntese *de novo* do receptor B₁ é importante para o aumento das respostas funcionais mediadas por este receptor também *in vitro*. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a expressão dos receptores B₁ e a evolução do dano tecidual observado na colite por TNBS dependem significativamente do processo de síntese protéica.

Convencionalmente, o tratamento de inflamações crônicas, como a IBD, está fortemente relacionado com o uso de drogas antiinflamatórias, que abrangem estudos científicos envolvendo citocinas pró-inflamatórias, fatores como o NF-κB e enzimas como as MAPKs. Diferentemente dos alvos já estudados na CD e na UC, no presente trabalho optou-se por estudar uma nova via, a da PI3K γ (quinase citoplasmática, encontrada principalmente em células do sistema hematopoiético), de forma geral estudada até então somente em modelos de patologias crônicas como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (Barber *et al.*, 2005; Camps *et al.*, 2005).

As PI3Ks (fosfatidil inositol-3-quinases) são proteínas intracelulares que têm um importante papel no desenvolvimento da resposta imune, inflamação e crescimento tumoral (para revisão ver: Ohashi e Woodgett, 2005; Hawkins *et al.*, 2006). Baseando-se nas características estruturais e especificidade ao substrato a família das PI3Ks, pode ser dividida em três classes: I (subdividida em IA e IB), II e III. Todas as isoformas, independente da classe, são capazes de fosforilar lipídios de PI (fosfatidilinositol) na posição D₃ do anel inositol, gerando uma variedade de segundos mensageiros (Hawkins *et al.*, 2006). A classe I A consiste nas isoformas

PI3K α , PI3K β e PI3K δ e a classe I B consiste somente na isoforma PI3K γ ; essas isoformas controlam muitas funções celulares como proliferação, crescimento, sobrevivência, apoptose, migração e adesão celular. As PI3Ks possuem um importante papel na sinalização de leucócitos e conseqüentemente representam um alvo promissor na intervenção da via de sinalização onde estão envolvidos processos inflamatórios e de doenças auto-imunes. A classe II contém três membros PI3K-C2 α , PI3K-C2 β e PI3K-C γ e a classe III apresenta um único membro o qual é homólogo da *Saccharomyces cerevisiae* Vps34p (Chen *et al.*, 2005).

Após estimulação celular as PI3Ks são recrutadas para a superfície da membrana plasmática. E desse modo, quimiocinas MCP-1 ou fator de complemento C5a ligados a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) desencadeiam o aumento da atividade da PI3K γ , e das PI3K α,β e δ que são ativadas por receptores tirosina quinase (RTKs) através da ligação com o fator estimulador de colônia (CSF-1). A ativação dessas PI3Ks leva à formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) por fosforilação da fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2). A interação entre proteína quinase B (PKB) com PIP3 na membrana da célula estimula a fosforilação de alvos essenciais que promovem múltiplas conseqüências biológicas, incluindo o processo inflamatório e a sobrevivência celular. Os poucos trabalhos publicados até então, Camps *et al.*, (2005) e Barber *et al.*, (2005) mostraram que os compostos AS-605240 (5-quinoxalina-6-ylmetileno-thiazolidina-2,4-diona) e AS-604850 (5-(2,2 difluorobenzo{1,3}dioxol-5-ylmetileno)-thiazolidina-2,4-diona) bloqueiam a (PI3K) γ , mas não a (PI3K) α,β e δ . Experimentos utilizando AS605240 na artrite e lúpus eritematoso sistêmico (Barber *et al.*, 2005) demonstraram significativa redução do processo inflamatório em ambos os casos.

Na seqüência do presente estudo, a fim de investigar a participação da PI3K γ na indução do receptor B₁ na colite induzida por TNBS e no dano tecidual colônico, os animais foram tratados desde o jejum, com o composto AS605240. Os resultados observados em cólons provenientes de animais tratados com o inibidor seletivo da PI3K γ demonstram uma significativa redução da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, bem como uma redução significativa no dano tecidual colônico em comparação com os respectivos controles (colite sem tratamento). Dessa forma, é possível sugerir que a via da PI3K γ , pouco explorada até então no que diz respeito à IBD e as cininas, contribui para a indução dos receptores B₁ bem como ao dano tecidual característico da colite por TNBS. Desse modo, pode-se sugerir que a via da PI3K γ constitui um alvo promissor a ser amplamente explorado na IBD e no sistema caliceína-cininas.

Diversos estudos têm descrito que o fator transcricional NF- κ B é um componente crucial na mediação de respostas inflamatórias, promovendo a indução de genes de mais de duas centenas de proteínas, incluindo algumas pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas, enzimas que geram mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e diversos tipos de receptores (Barnes e Karin, 1997; Li e Verma, 2002). Dessa forma, essa via tem sido amplamente relacionada a várias doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, asma, sepse, aterosclerose, colite ulcerativa e diversos tipos de câncer (Baldwin, 2001).

Quanto à IBD, uma ativação sustentada do NF- κ B parece estar intimamente relacionada à inflamação intestinal crônica, sendo essa ativação identificada também na lâmina própria intestinal de pacientes com CD e em modelos murinos de colite por TNBS (Rogler *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998; Neurath *et al.*, 1996). Recentemente, têm sido descrito nos trabalhos de Nenci *et al.*, (2007), Zaph *et al.*,

(2007) e Ben-Neriah e Smidt-Suprian (2007), que o NF- κ B parece ser o principal mecanismo a interferir na integridade epitelial intestinal, controlando dessa forma, alguns genes cujos produtos irão promover a interação entre as defesas imunes da mucosa e a microflora intestinal. Em relação às cininas, alguns trabalhos demonstram que o fenômeno da indução dos receptores B₁ envolve a ativação de fatores transcricionais. Essas evidências são confirmadas por dados que revelam a presença de seqüências na região promotora do gene do receptor B₁ candidatas à ligação de fatores de transcrição incluindo AP-1, CREB, SP-1, PEA-3, NF- κ B, entre outros (Ni *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Angers *et al.*, 2000). Trabalhos como o de Ni *et al.*, (1998) demonstraram que o sítio para ligação do NF- κ B na região promotora do receptor B₁ é suficiente para a indução do receptor em resposta ao estímulo por LPS, IL-1 β ou TNF α . Resultados obtidos em outros trabalhos demonstram a participação do NF- κ B no aumento das respostas mediadas pelos receptores B₁ na aorta de coelho (Medeiros *et al.*, 2001), em tecidos obtidos em animais adrenalectomizados (Cabrini *et al.*, 2001), ou ainda em patas de ratos injetadas com o agente quimiotático PAF ou LPS (Fernandes *et al.*, 2003; Passos *et al.*, 2004). Assim, passou-se a investigar a participação do fator NF- κ B na indução do receptor B₁ na colite induzida por TNBS em cólons de camundongos tratados ou não desde o jejum com o inibidor da ativação do NF- κ B, o PDTTC. Além disso, foram realizadas análises histológicas dos cólons provenientes destes animais. Os resultados do presente estudo mostram redução das respostas contráteis à des-Arg⁹-BK em cólons obtidos de animais tratados com PDTTC, bem como redução do dano tecidual. Esses dados funcionais e histológicos ampliam a noção de que o NF- κ B é crucial para a expressão dos receptores B₁ *in vivo*, exercendo um importante papel na indução do dano tecidual observado na colite.

Inúmeras evidências têm sugerido que diversas citocinas antiinflamatórias e pró-inflamatórias são de extrema importância para a IBD. O clássico paradigma entre as respostas T_{H1} e T_{H2} consiste no fato de que algumas citocinas como o $TNF\alpha$, a IL-12 e o $INF\gamma$ classicamente conhecidas como T_{H1} iniciariam as respostas inflamatórias na CD e na UC. No entanto, ambas as respostas T_{H1} e T_{H2} estariam envolvidas tanto no início quanto na cronicidade da IBD (Podolky, 2002; Bouma e Strober 2003). Através desse conhecimento, citocinas como o $TNF\alpha$ e a IL-12, que parecem atuar em todas as fases da IBD tornaram-se os exemplos de maior sucesso quanto à intervenção terapêutica (Cominelli, 2004). O $TNF\alpha$ é uma citocina sintetizada durante o processo inflamatório por diferentes tipos celulares, como macrófagos e mastócitos em resposta a vários estímulos inflamatórios como espécies reativas de oxigênio e NO; suas ações podem ser bloqueadas com a utilização de estratégias que incluem inibição da sua síntese, liberação ou atividade biológica (Bobin-Dubigeon *et al.*, 2001). Dos inibidores de $TNF\alpha$, a talidomida e o infliximab são os que têm trazido os resultados mais interessantes. A talidomida por reduzir a meia-vida do seu RNAm inibe a produção de $TNF\alpha$ (Moreira *et al.*, 1993; Bobin-Dubigeon *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004) e o infliximab, por ser um anticorpo monoclonal quimérico bloqueia a atividade do $TNF\alpha$ e induz a apoptose de células inflamatórias, melhorando dessa forma, o quadro clínico de muitos pacientes com IBD (Bickston e Cominelli, 1998; D'Haens *et al.*, 1999; Ogata e Hibi, 2003; Cominelli, 2004; Lichtenstein *et al.*, 2006). Entretanto, alguns resultados acerca da utilização do infliximab são controversos pois, têm sido descrito em alguns casos, o surgimento de complicações como tuberculose, lúpus eritematoso e linfoma (Ogata e Hibi, 2003; Cominelli, 2004).

Por outro lado, tem sido amplamente descrito a participação de citocinas pró-inflamatórias e células inflamatórias na modulação das respostas mediadas pelos receptores B₁ das cininas (Fernandes *et al.*, 2003; Gama Landgraf *et al.*, 2004; Passos *et al.*, 2004). Trabalhos como o de Fernandes *et al.*, (2005) têm demonstrado que na seqüência de eventos que levam a expressão do receptor B₁ na pata de rato, após estímulo nocivo com PAF, estão os aumentos de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL1- β . Desse modo, passou-se a investigar no presente trabalho se a citocina TNF α poderia estar modulando a indução *in vivo* do receptor B₁, bem como, o dano tecidual na colite. Para tanto, animais foram tratados desde o jejum com o inibidor do TNF α a talidomida ou com o anticorpo quimérico anti-TNF α o infliximab. Os resultados obtidos em preparações de cólons de animais submetidos aos respectivos tratamentos indicam que a citocina TNF α contribui significativamente para a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, bem como o dano tecidual na colite, uma vez que o bloqueio da produção ou dos receptores de TNF- α reduziu a contração induzida pela des-Arg⁹-BK, bem como o dano tecidual causado pelo TNBS. Tais resultados sugerem que na colite induzida por TNBS a expressão do receptor B₁ pode ser modulada por essa citocina. A fim de comprovar a participação do TNF α na indução do receptor B₁ na inflamação intestinal, realizou-se a indução da colite em animais com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α (TNF α p55^{-/-}) para posterior montagem e desafio dos cólons frente à des-Arg⁹-BK. Os resultados demonstraram que as respostas contráteis à des-Arg⁹-BK obtidas após 72 h da indução da colite foram significativamente menores do que as observadas em animais controles (colite em animais C57/BL6), confirmando a participação do TNF α na indução dos receptores B₁ na colite bem como ampliando a noção da importância desta citocina para o sistema calicreína-cininas.

Finalmente, outra via avaliada foi a do óxido nítrico (NO). O NO é gerado a partir da oxidação de elétrons do aminoácido L-arginina, podendo ser produzido por diversas células incluindo endotélio vascular, neurônios do SNC e SNE e células do sistema imune (Moncada, 1992; Nathan e Xie, 1994). O NO é produzido por enzimas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS), dentre elas, existem duas isoformas que se encontram expressas constitutivamente a NOS neural (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS) cujas denominações fazem a alusão ao tecido onde foi descrito. A terceira isoforma é a NOS indutível (iNOS ou NOS II), tipicamente expressa em resposta a estímulos nocivos (Nathan e Xie, 1994). O NO, depois de liberado, se difunde rapidamente do local onde foi sintetizado podendo permear membranas celulares e interagir com sítios de moléculas intracelulares. Além disso, o NO possui instabilidade intrínseca, propriedade essa que elimina a necessidade de receptores extracelulares ou alvos de degradação (Moncada, 1992; Nathan e Xie, 1994). Alterações na regulação do NO têm sido descritas em muitas doenças do trato gastrointestinal; mais especificadamente a produção de NO apresenta-se aumentada na UC, na CD, no megacólon, na diverticulite e na diarreia, bem como em modelos de inflamação intestinal (Boughton-Smith *et al.*, 1993; Iwashita *et al.*, 1995). Entretanto, a contribuição das três isoformas da NOS na regulação das respostas inflamatórias no trato gastrointestinal ainda são desconhecidas (Beck *et al.*, 2004). No intestino, é atribuído ao NO a função de regular a permeabilidade intestinal e diferentemente de outros tecidos, a presença da iNOS como uma enzima constitutiva se deve ao fato de que a mucosa intestinal é exposta a diversos antígenos como bactérias e sub-produtos de bactérias que servem de estímulo para sua expressão (Kubes, 1992). Foi também demonstrado que as enzimas iNOS, eNOS e nNOS possuem um papel crucial na homeostasia do trato gastrointestinal

sendo de extrema importância para a progressão da IBD. Trabalhos como o de Zingarelli *et al.*, (1999) reportam proteção tecidual e sobrevivência significativamente maior em animais com deleção gênica para a iNOS^{-/-} no modelo de colite crônica por TNBS quando comparado com os respectivos controles. Sasaki *et al.*, (2003) demonstraram que em animais deleção gênica para a eNOS^{-/-} ocorre exacerbada resposta inflamatória na colite por DSS, sugerindo um papel protetor para a eNOS. Por outro lado, Beck *et al.*, (2004) descrevem que animais com deleção gênica para a nNOS são mais suscetíveis ao dano tecidual produzido pelo DSS apresentando também maior índice de mortalidade.

Quanto às cininas, têm sido amplamente descrito que a expressão dos receptores B₁ pode sofrer importante influência pela ação de enzimas pró-inflamatórias como a COX2 e a iNOS, sendo que estímulos que são capazes de aumentar a expressão dos receptores B₁ são também descritos como necessários para a regulação dessas enzimas (Zhou *et al.*, 1998; 1999; Dixon *et al.*, 2000; Haddad *et al.*, 2000; Lasa *et al.*, 2001; Dixon, 2004; Calixto *et al.*, 2004). Desta forma, na continuidade dos estudos, foi avaliado o papel da iNOS na indução dos receptores B₁, e no dano tecidual na colite induzida por TNBS. Para isso, os animais foram tratados desde o jejum com o inibidor seletivo da iNOS 1400W e foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK em cólons obtidos 72 h após o início da colite por TNBS. Os resultados demonstram que o tratamento com 1400W foi capaz de reduzir a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, quando comparado ao grupo controle (colite sem tratamento) sugerindo assim, que a iNOS poderia participar na indução dos receptores B₁ na colite. Ademais, na observação histológica, foi possível constatar que o tratamento com 1400W promoveu proteção tecidual. Para confirmar a importância da iNOS na indução *in*

vivo dos receptores B₁ na colite, passou-se a utilizar animais com deleção gênica para a iNOS (iNOS^{-/-}). Os resultados obtidos demonstraram que houve significativa redução da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK em cólons provenientes de animais iNOS^{-/-} submetidos a colite experimental por TNBS quando comparado com os animais controles (colite em animais C57/BL6). Em conjunto, esses resultados confirmam e estendem os dados da literatura acerca da contribuição da enzima iNOS na indução dos receptores B₁ bem como no dano tecidual característico da colite por TNBS.

Nesta terceira série de resultados discutidos, foi observado que a indução *in vivo* dos receptores B₁, bem como o dano tecidual evidenciado na colite, dependem necessariamente de diversos fatores como indução da síntese protéica, participação da via da PI3K γ , do fator transcrição nuclear NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias como TNF α e finalmente da participação da enzima iNOS. Esses resultados complementam dados da literatura acerca da indução dos receptores B₁ principalmente na IBD.

5.4. Análise das respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos obtidos após a indução da colite por TNBS

De forma relevante, os estudos que envolvem o papel dos receptores B₁ na dor e na inflamação tiveram início depois dos estudos de clonagem e seqüenciamento desse receptor. Sendo assim, os primeiros trabalhos realizados, demonstraram que os receptores B₁ possuíam uma expressão *in vivo* regulada por citocinas pró-inflamatórias (como discutido na seção anterior) ou por estímulos traumáticos (Calixto *et al.*, 2004). Diversos estudos têm indicado a existência de

importante interação entre os receptores B₁ e B₂ e demonstram que a persistente estimulação dos receptores B₂ pode resultar na indução dos receptores B₁ (Rashid *et al.*, 2004). Ademais, tem sido proposto, que os receptores B₂ na ocorrência de estimulação causam transitório aumento da concentração de Ca²⁺ que colaboraria para o fenômeno da dessensibilização desse receptor; entretanto, isto parece não ocorrer com os receptores B₁. Recentes estudos têm demonstrado que o receptor B₁ ao contrário dos receptores B₂ não é internalizado após a estimulação com o agonista, mas sim, se transloca através de mecanismos mediados por cavéolas, provavelmente esse fato é o responsável por facilitar a reciclagem e a amplificação das respostas mediadas pelo receptor B₁ (Campos *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1998; Modéer *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Phagoo *et al.*, 1999; 2000; Sabourin *et al.*, 2002; Calixto *et al.*, 2004; Marceau e Regoli 2004).

De acordo com a literatura onde na colite ocorre aumento dos receptores B₁ (Stadnicki, 2005), procurou-se investigar alguns dos mecanismos que estariam envolvidos na resposta do receptor B₁ após indução da colite por TNBS. Inicialmente, com o objetivo de analisar o perfil farmacológico mediado pelo agonista do receptor B₁, foram utilizados antagonistas seletivos das cininas nessa preparação. Desse modo utilizou-se o antagonista para o receptor B₁ o R715 e para o receptor B₂ o FR 173657. Os resultados obtidos em preparações de cólons montadas após 72 h de inflamação colônica demonstraram que o antagonista R715 causou redução da resposta contrátil ao agonista B₁ de maneira concentração-dependente, apresentando um perfil farmacológico de antagonismo competitivo irreversível. Entretanto, o antagonista seletivo para o receptor B₂ o FR 173657 não foi capaz de modificar a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons inflamados. Esses resultados novamente confirmam a presença dos receptores B₁

após a indução da colite por TNBS e estão de acordo com os descritos em outras preparações teciduais como na íris isolada de porco após incubação com LPS (El Sayah *et al.*, 2006).

Resultados anteriores descritos para o receptor B₂ em conjunto com dados da literatura (Campos e Calixto, 1994; El Sayah e Calixto 2003b) demonstram a importante participação do Ca²⁺ nas respostas funcionais induzidas pela ativação dos receptores das cininas. No presente estudo, procurou-se também investigar a participação do Ca²⁺ e de canais de cálcio do tipo L na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK em cólons inflamados de camundongos. Para tal, cólons obtidos 72 h após a indução da colite foram montados e testadas suas respostas contráteis à des-Arg⁹-BK na presença ou na ausência de cálcio (líquido nutritivo de Krebs-Henseleit ausente de cálcio acrescido do quelante de cálcio EGTA, 1mM). Além disso, também foram testadas preparações de cólons com colite na presença da nicardipina (bloqueador de canal de cálcio do tipo L). Os resultados obtidos revelaram a total dependência do cálcio externo nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, bem como a participação de canais de cálcio do tipo L. Esses resultados estão de acordo com dados anteriores obtidos para o receptor B₁ em preparações de vesícula biliar após 6 h de montagem (Cabrini e Calixto, 1997), pois foi demonstrado que o cálcio externo e os canais de cálcio do tipo L também participam das respostas induzidas pela des-Arg⁹-BK nesse tecido.

Trabalhos têm demonstrado, que o dano tecidual causado na CD e na UC está diretamente associado aos mediadores que conduzem e amplificam a resposta inflamatória. Tem sido proposto que, na fase de amplificação da resposta inflamatória, ocorre migração celular (também evidenciada na padronização da colite por TNBS em camundongos pela atividade da MPO), produção de diversos

mediadores pró-inflamatórios principalmente eicosanóides (prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs)) e citocinas (Yang, 1996; Wallace e Ma, 2001). Esses diferentes eicosanóides são potentes mediadores do processo inflamatório intestinal e a inibição da sua produção tem sido referida como uma possível alternativa terapêutica (Greaves e Camp, 1998; Krinsky *et al.* 2003). Os eicosanóides constituem duas principais famílias de derivados da via do ácido araquidônico, que são os derivados da via das ciclooxigenases (COX1 e 2) que irão produzir PGs e TXs e os derivados da via das lipooxigenases (LOX) que irão produzir LTs e os ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs). Ademais, tem sido proposto que as cininas são potentes indutores da liberação de prostanóides por causarem ativação citosólica da PLA₂, em um processo dependente de cálcio citosólico livre, o que conseqüentemente leva à liberação, na membrana celular, de ácido araquidônico para posterior formação de prostanóides (Tanaka, 1995; Schlemper *et al.*, 2005). Desse modo, neste trabalho, também procurou-se investigar o envolvimento da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos obtidos 72 h após a colite por TNBS. Os resultados obtidos com a utilização dos inibidores da fosfolipase A₂ (PLA₂) PACOCF3, do inibidor da fosfolipase C (PLC) U73122, do inibidor não seletivo para as COXs indometacina, do inibidor seletivo da COX-2 DFU ou do inibidor preferencial da COX-1 SC560, nessa preparação, mostraram significativa redução da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, confirmando assim o envolvimento da via do ácido araquidônico e seus metabólitos nas respostas funcionais dos receptores B₁ na colite por TNBS. No entanto, um desses resultados, o que se refere ao antagonista seletivo do receptor de leucotrieno D₄ o MK571, difere dos dados obtidos anteriormente para o receptor B₁, bem como dos observados em

preparações de vesícula biliar onde a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK mostrou ser dependente da liberação e ativação de leucotrienos D₄ (Cabrini e Calixto, 1997). Entretanto, este resultado merece ser revisto, uma vez que no trabalho de Wardle *et al.*, (1993), foram descritos níveis elevados de leucotrieno D₄ em meios contendo biopsias de pacientes com colite ulcerativa - sugerindo dessa forma que a via do LTD₄ é importante na colite.

Diversos estudos têm demonstrado que a ativação dos receptores das cininas leva a produção de agentes vasoativos como o NO (Regoli e Barabé, 1980; Vane e Botting *et al.*, 1987; Cahil *et al.*, 1988; Ahluwalia e Perretti, 1999). Como demonstrado na série de experimentos discutidos no presente estudo, o NO e as enzimas que são responsáveis pela sua síntese parecem exercer grande influência na inflamação colônica e na indução dos receptores B₁ (Kubes e McCafferty, 2000; Dixon, 2004; Calixto *et al.*, 2004). Complementando estas evidências, na seqüência, investigou-se o papel das isoformas da NOS na resposta à des-Arg⁹-BK em tecidos colônicos montados após 72 h de colite por TNBS. Os resultados obtidos após a incubação com o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) aminoguanidina, ou do inibidor da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) L-NIO, ou do inibidor seletivo da iNOS 1400W, mostram significativa redução da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, sugerindo assim a participação dessas enzimas na regulação da resposta funcional dos receptores B₁ em preparações de cólons com colite.

Diversos estudos têm confirmado que a fosforilação de proteínas exerce importante papel na regulação de muitos processos celulares incluindo a expressão de genes e a síntese protéica (Hunter, 1995). Entretanto, tem sido sugerido que a ativação de MAPKs é essencial para a indução do receptor B₁. Estudos como o de

Larrivéé *et al.*, (1998) demonstraram que tanto a indução do receptor B₁ após trauma tecidual, quanto à induzida por IL-1 β , em aorta de coelhos, é significativamente sensível a inibidores de tirosina quinase. Adicionalmente, Schanstra *et al.*, (1998), demonstram que a ativação da PKC regula a expressão do RNAm dos receptores B₁ em fibroblastos de pulmão humano. Entretanto, recentemente foi sugerida a regulação *in vitro* do RNAm dos receptores B₁, pela p38-MAPK e a c-Jun NH₂-terminal quinase (JNK) na veia porta de ratos (Medeiros *et al.*, 2004). No presente trabalho, foi investigado também o envolvimento de algumas proteínas quinases nas respostas contrateis induzidas pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos. Os resultados obtidos na utilização dos inibidores da proteína quinase A (PKA) KT5720, da proteína quinase C (PKC) GF109203X, da phosphoinositide 3-quinase γ (PI3K γ) AS605240 ou da MEK1/2 PD98059, em preparações de cólon montadas após 72 h da indução da colite por TNBS, mostraram significativa redução das respostas contrateis induzidas pela des-Arg⁹-BK indicando o envolvimento dessas quinases na resposta funcional mediada pelos receptores B₁.

Analisados em conjunto, os resultados deste quarto e último bloco de resultados confirmam e estendem as evidências acerca da participação dos receptores B₁ nas respostas contrateis do cólon de camundongos com colite. Ademais, dentre os diversos mecanismos que estariam envolvidos nas respostas transduccionais mediadas após a ativação dos receptores B₁ em preparações de cólons de camundongo com colite, é possível sugerir que as respostas funcionais mediadas por esse receptor, nessa preparação, envolvem o influxo de cálcio do meio extracelular, bem como de canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, a via dos metabólitos do ácido araquidônico, a participação da NOS e das isoformas

iNOS e eNOS bem como a via de sinalização intracelular das proteínas quinases envolvendo PKA, PKC, PI3K γ e MEK.

Embora os componentes do sistema calicreína-cininas vêm sendo estudados desde 1909, pesquisas relacionadas a esses peptídios são de grande interesse, pois as cininas parecem exercer funções fundamentais para a homeostasia de diversos processos fisiológicos. Recentes trabalhos têm descrito a participação do sistema calicreína-cininas na IBD bem como, o aumento da expressão dos receptores B₁ e B₂ nessa patologia. No entanto, até o momento, são escassos os trabalhos que se propõem a investigar o papel das cininas na UC, bem como analisar os mecanismos envolvidos nas respostas contráteis das cininas no cólon. Os resultados do presente trabalho contribuem para o entendimento do papel das cininas na IBD, bem como avalia alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelas cininas em cólons de camundongos normais ou com colite por TNBS. Desse modo, é sugerido, que o sistema das cininas constitui um alvo promissor para uma nova alternativa terapêutica na IBD.

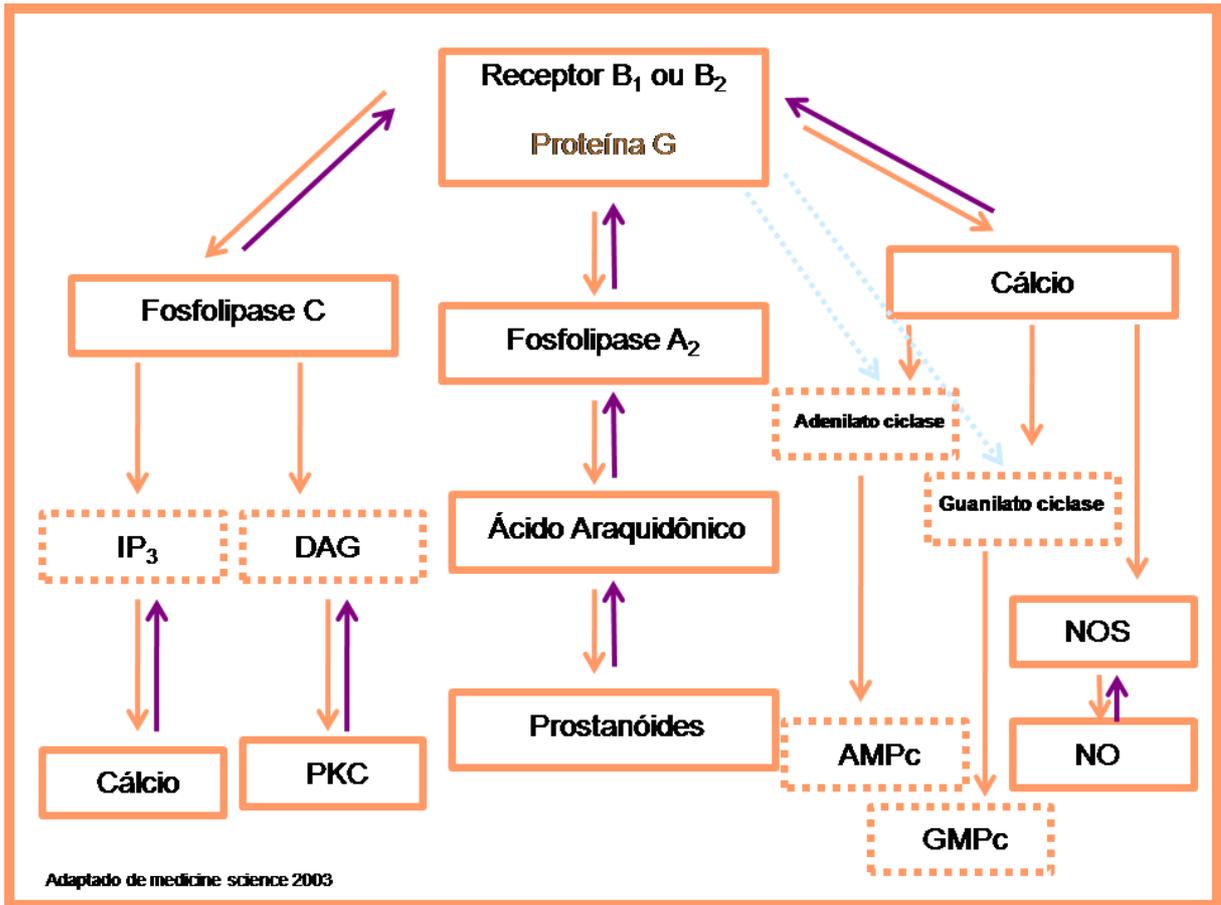


Figura 30. Vias de transdução de sinal que estão associadas às respostas das cininas. As setas em rosa claro exemplificam as vias que podem ser moduladas pela ativação dos receptores B₁ e B₂. As setas em roxo demonstram alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas das cininas.

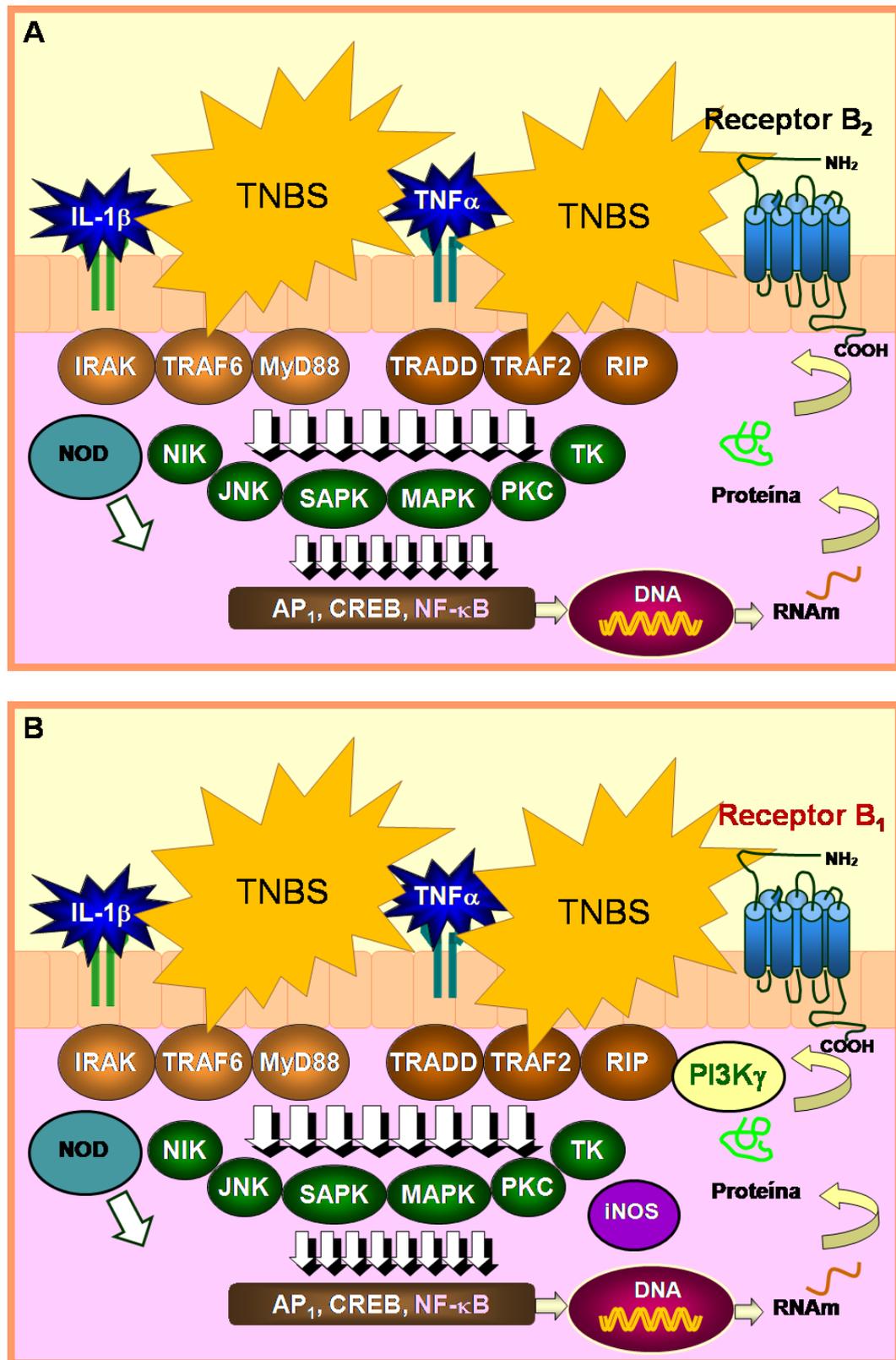


Figura 31. Exemplo de algumas vias de sinalização celular, que podem influenciar na indução dos receptores B₁ e B₂ para as cininas na colite por TNBS. Em (A), possíveis mecanismos que corroboram para a indução do receptor B₂ das cininas após a indução da colite. Em (B), possíveis mecanismos envolvidos na indução do receptor B₁ das cininas após a indução da colite.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou, através de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular que:

∞ A resposta contrátil induzida pela BK e análogos, em preparações de cólons de camundongos, é mediada pela ativação de receptores B₂ constitutivos e não pelos receptores B₁. No entanto pode ser evidenciado um aumento tempo-dependente, nas respostas mediadas pelos receptores B₁ *in vitro*;

∞ A resposta contrátil à BK no cólon de camundongo demonstrou ser dependente do influxo de cálcio do meio extracelular, de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e N, do sistema colinérgico, de canais de sódio sensíveis a TTX, de metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, da participação de neuropeptídeos como SP, neurocinina B e o CGRP e finalmente demonstrou ser mediadas pela interação com receptores do tipo TRPV1;

∞ O aumento da resposta contrátil induzida tanto pela BK quanto pela des-Arg⁹-BK em cólons de camundongos com colite por TNBS, foi tempo-dependente e está relacionada com o aumento nos níveis de RNAm e da população (densidade) de ambos os receptores B₁ e B₂ para as cininas;

☞ Animais com deleção gênica para os receptores B₁ ou B₂ para a cininas apresentaram reduzido dano tecidual após colite por TNBS, sugerindo assim a participação dos receptores para as cininas principalmente dos receptores B₁ na gênese da colite ulcerativa;

☞ A indução *in vivo* dos receptores B₁, bem como o dano tecidual evidenciado na colite, depende de fatores como indução da síntese protéica, participação da via da PI3K γ , do fator transcrição nuclear NF- κ B, de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e da participação da enzima iNOS;

☞ As respostas funcionais mediadas pelo receptor B₁ envolvem o influxo de cálcio do meio extracelular, canais de cálcio o tipo L, a via do ácido araquidônico, a participação da NOS e das isoformas da iNOS e eNOS bem como pela via de sinalização intracelular PKA, PKC, PI3K γ e MEK;

☞ Quando preparações de cólons foram analisadas quanto ao perfil farmacológico com os antagonistas dos receptores B₂ Hoe 140 ou FR173657, observou-se diminuição das respostas contráteis, concentração-dependente, caracterizando antagonismo do tipo competitivo irreversível. Além disso, preparações avaliadas 6h após a montagem ou preparações de cólons obtidas 72 h após colite por TNBS, quando incubadas com o antagonista dos receptores B₁ o R715 também demonstraram diminuição das respostas contráteis, concentração-dependente evidenciando antagonismo do tipo competitivo irreversível;

∞ Os resultados analisados em conjunto contribuem para uma melhor compreensão acerca do envolvimento das cininas e de seus receptores B₁ e B₂ na colite experimental induzida por TNBS. Esses resultados sugerem fortemente o possível emprego de antagonistas seletivos das cininas, especialmente para o receptor B₁, no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da IBD.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abelous, J. E., Bardier, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. **C. R. Senaces. Soc. Biol.**, 66:511, 1909.
- Ahluwalia, A., Perretti, M. B₁ receptors as a new inflammatory target, Could this B the 1. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 20:100-104, 1999.
- Ali, L., Sarna, S. K. Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colon circular muscle cells. **Gastroenterology.**, 122:483-494, 2002.
- Amsterdam, A., Tajima, K., Sasson, R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. **Biochem. Pharmacol.**, 64:843-850, 2002.
- Andrade, E. L., Ferreira, J., André, E., Calixto, J, B. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. **Biochem Pharmacol.**, 72:104-114, 2006.
- Angers, M., Drouin, R., Bachvarova, M., Paradis, I., Marceau, F., Bachvarov, D. R. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B (1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. **J. Cell. Biochem.**, 78:278-296, 2000.
- Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Wirth KJ, Okayasu I. Effect of icatibant, a bradykinin B₂ receptor antagonist, on the development of experimental ulcerative colitis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, 44:845-851,1999.
- Araújo, R. C., Kettritz, R., Fichtner, I., Paiva, A. C. M., Pesquero, J. B., Bader, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B₁ receptor-deficient mice. **Biol. Chem.**, 382: 91-95, 2001.
- Audet, R., Peticlerc, E., Drapeau, G., Rioux, F., Marceau, F. Further analysis of the up-regulation of bradykinin B₁ receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, 271:551-555, 1994.
- Baldwin, A. S. The NF-kappaB proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, 14:649-683, 1996.
- Baldwin JR, A. S. The transcription factor NF-kB and human diseases. **J. Clin. Invest.**, 107:3-6, 2001.
- Bamias, G., Cominelli, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 23:365-369, 2007.
- Barber, D.F., Bartolomé, A., Hernandez, C., Flores, J.M., Redondo, C., Fernandez-Arias, C., *et al.* PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. **Nat. Med.**, 11: 933-935, 2005.

- Barnes, P. J., Karin, M. Nuclear factor- κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, 336:1066-1071, 1997.
- Bartus, R.T., Elliot, P.J., Dean, R.L., Hayward, N.J., Nagle, T.L., Huff, M.R. *et al.* Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7. **Exp. Neurol.**, 142:14-28, 1996.
- Bascands, J-L., Pecher, C., Bompard, G., Rakotoarivony, J., Tack, J. L., Girolami, J-P. Bradykinin-induced in vitro contraction of rat mesangial cells via a B₂ receptor type. **Am. J. Physiol.**, 267: F871-F878, 1994.
- Bauerle, P. A., Baltimore, D. NF- κ B: ten years after. **Cell.**, 87:13-20, 1996.
- Baumgart, D., Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet.**, 369:1627-1640, 2007.
- Beck, P.L., Xavier, R., Wong, J., Ezedi, I., Mashimo, H., Mizoguchi, A., *et al.* Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 286: G137-G147, 2004.
- Ben-Neriah, Y., Schmidt-Supprian, M. Epithelial NF- κ B maintains host gut microflora homeostasis. **Nature Immunology.**, 8:479-481, 2007.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., Worthy, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44:1-80, 1992.
- Bickston, S. J., Cominelli, F. Treatment of Crohn's disease at the turn of the century. **N. Engl. J. Med.**, 339:401-402, 1998.
- Bobin-Dubigeon, C., Collin, X., Grimaud, N., Robert, J-M., Le Baut, G., Petit, J-Y. Effects of tumor necrosis factor- α synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. **Eur. J. Pharmacol.**, 431: 103-110, 2001.
- Boissonas, R. A., Guttman, S., Jaquenoud, P. A. Synthèse de la L-arginyl-L-propyl-L-propyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-arginine, un nonapeptideo présentant les propriétés de la bradykinine. **Helv. Chim. Acta.**, 43:1349-1358, 1960.
- Born, M. E. A., Bouma, G. Animal models of inflammatory bowel disease. Animal models of inflammatory bowel disease. **Drug. Discovery. Today: Disease Models.**, 1:437-443, 2004.
- Borkowski, J.A., Ranson, R.W., Seabrook, E. R., Trumbauer, M., Chen, H., Hill, R. E., Strader, C. D., Hess, J. F. Target disruption of bradykinin B₂ receptor gene eliminates bradykinin action in smooth muscles and neurons. **J. Biol. Chem.**, 270:13706-13710, 1995.
- Boschov, P., Paiva, A. C., Paiva, T. B., Shimuta, S. I. Further evidence for the existence of two receptor sites for bradykinin responsible for the diphasic effect in the rat isolated duodenum. **Br. J. Pharmacol.**, 83: 591-600, 1984.

- Boughton-Smith, N. K., Evans, S. M., Hawkey, C.J., Cole, A. T., Balsitis, M., Whittle, B. J., *et al.* Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Lancet.**, 342:338-340, 1993.
- Bouma, G., Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat. Immunol.**, 3:521-533, 2003.
- Boyce, S., Rupniak, N. M. J., Carlson, E. J., Webb, J., Borkowski, J. A., Hess, J. F., Strader, C. D., Hill, R. G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ kinin receptor knockout mice. **Immunopharmacology.**, 33:333-335, 1996.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 74:3805-3809, 1976.
- Burguess, G. M., Perkins, M. N., Rang, H. P., Camobell, E. A., Brown, M. C., McIntyre, P., *et al.* Bradyzide a potent non-peptide receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 129:77-86, 2000.
- Cabrini, D. A., Calixto, J. B. Characterization of des-Arg⁹-bradykinin-induced contraction in guinea-pig gallbladder *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, 331: 31-38, 1997.
- Cabrini, D. A., Campos, M. M., Trastsk, K. S., Merino, V. F., Silva JR, J. A., Souza, G. E., Avellar, M. C., Pesquero, J. B., Calixto, J. B. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B₁ receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 132:567-577, 2001.
- Cabrini, D. A., Kyle, D.J., Calixto, J.B. A Pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277:299-307, 1996.
- Cabrini, D. A., Silva, A. M., Calixto, J. B. Mechanisms of bradykinin-induced contraction of the guinea-pig gallblader *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1549-1556, 1995.
- Cahill, H., Fishmann, J. B., Polgar, P. Effect of des arginine-9-brdykinin and other bradykinin fragments on the synthesis of prostacyclin and the binding of bradykinin by vascular cells in culture. **Agents. Actions.**, 24: 224-231, 1988.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain.**, 87:1-5, 2000.
- Calixto, J. B., Medeiros, Y. S. Characterization of bradykinin mediating pertussis toxin-insensitive biphasic response in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 259:659-665, 1991.

- Calixto, J.B., Medeiros, R., Fernandes, E.S., Ferreira, J., Cabrini, D.A., Campos, M.M. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br. J. Pharmacol.**, 143:803-818, 2004.
- Calixto, J. B., Pizzolatti, M. G., Yunes, R. A. The competitive antagonistic effect of compounds from *Mandevilla velutina* on kinin-induced contractions of rat uterus and guinea-pig ileum in vitro. **Br.J.Pharmacol.**, 94:1133-1142, 1988.
- Campos, A. H., Calixto, J. B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: Mediation by B₁ and B₂ receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268:902-909, 1994.
- Campos, M. M., Cabrini, D. A., Cardozo, A.H., Rae, G. A., Toro, J. H., Calixto, J. B. Changes in paw oedema triggered via bradykinin B(1) and B(2) receptors in streptozotocin-diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 416: 169-177, 2001.
- Campos, M. M., Leal, P. C., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Non-peptide antagonists for kinin B₁ receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **TIPS.**, 27: 646-651, 2006.
- Campos, M. M., Souza, G. E., Calixto, J. B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. **Br. J. Pharmacol.**, 127:1851-1859, 1999.
- Campos, M. M., Souza, G. E., Calixto, J. B. Modulation of kinin B₁ but not B₂ receptors-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha. **Peptides.**, 19: 1269-1276, 1998.
- Campos, M. M., Souza, G. E., Calixto, J. B. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 117:793-798, 1996.
- Campos, M.M., Souza, G.E., Ricci, N.D., Pesquero, J.L., Teixeira, M.M., Calixto, J.B. The role of migrating leukocytes in IL-1β-induced up-regulation of kinin B₁ receptors in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 135:1107-1114, 2002.
- Camps, M., Rückle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. **Nat. Med.**, 11: 936-943, 2005.
- Cayla, C., Todiras, M., Iliescu, R., Saul, V.V., Gross, V., Pilz, B., *et al.* Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. **FASEB. J.**, 21:1689-1698, 2007.
- Chen L, Richards GP, Chao L, Chao J. Molecular cloning, purification and *in situ* localization of human colon kallikrein. **Biochem. J.**, 307:481-486, 1995.
- Chen, K., Iribarren, P., Gong, W., Wang, J. The essential role of phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) in regulating pro-inflammatory responses and the progression of cancer. **Cell. Mol. Immunol.**, (2): 241-252, 2005.

- Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature.**, 426:517-524, 2003.
- Clements, J.A. The glandular kallikrein family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. **Endocr. Rev.**, 10:393-419, 1989.
- Cloutier, F., Couture, R. Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B₁ and B₂ receptor agonists in the spinal cord. **Br. J. Pharmacol.**, 130:375-385, 2000.
- Cohen, R. D. Intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis: ready to stand alone? **Gastroenterology.**, 120:1541-1543, 2001.
- Colman, R. W. Biologic activities of the contact factors in vivo. **Tromb. Haemost.**, 82:1568-1577, 1999.
- Cominelli, F. Cytokine-based therapies for Crohn's disease - new paradigms. **N. Engl. J. Med.**, 351:2045-2048, 2004.
- Corrao, G., Tragnone, A., Caprilli, R. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study- Cooperative investigators of the Italian group for the study of colon and rectum (GISC). **Int. J. Epidemiol.**, 27:397-404, 1998.
- Cox, H. M., Munday, K. A., Poat, J. A. Identification of selective, high affinity [¹²⁵I]-angiotensin and [¹²⁵I]-bradykinin binding sites in rat intestinal epithelia. **Br. J. Pharmacol.**, 87:201-209, 1986.
- Crofford, L. J., Wilder, R. L., Ristimaki, A. P. Cyclooxygenase-1 and 2 expression in rheumatoid synovial tissues: effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.**, 93:1095-1101, 1994.
- Cuthbert, A. W., MacVinish, L.L. Transporting epithelia as targets for kinin effects. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 198A:203-210, 1986.
- Cuthbert AW, Margolius HS. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. **Br. J. Pharmacol.**, 75:587-598, 1982.
- Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D., *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **Br J Pharmacol.**, 135:496-510, 2002.
- Dalle, I. J., Maes, B. D., Geboes, K. P., Lemahieu, W., Geboes, K. Crohn's-like changes in the colon due to mycophenolate? **Colorectal. Dis.**, 7:27-34, 2005.
- Danese S, Fiocchi, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.**, 12 (30):4807-4812, 2006.
- Deblois, D., Horlick, R. A. Endotoxin sensitization to kinin B₁ receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and proinflammatory effects. **Br. J. Pharmacol.**, 132:327-335, 2001.

- De Campos, R. O. P., Alves, R. V., Ferreira, J., Kyle, D. J., Chakravarty, S., Mavunkel, B. J. Calixto, J. B. Oral antinociception and edema inhibition produced by NPC18884 a non-peptidic B₂ receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.**, 360:278-286,1999.
- Devani, M., Cugno, M., Vecchi, M., Ferrero, S., De Bernardino, F., Avesani, E.C., *et al.*, Kalikrein-kinin system activation in Crohn's disease: differences in intestinal and systemic markers. **Am. J. Gastroenterol.**, 97:2026-2032, 2002.
- Devani, M., Vecchi, M., Ferrero, S., Contessini Avesani, E., Arizzi, C., Chao, L., *et al.* Kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease : intestinal involvement and correlation with the degree of tissue inflammation. **Dig. Liver. Dis.**, 37: 665-673, 2005.
- Deblois, D., Marceau, F. The ability of des-Arg9-bradykinin to relax rabbit isolated mesenteric arteries is acquired during in vitro incubation. **Eur. J. Pharmacol.**, 142:141-144, 1987.
- D'Haens, G., Van Deventer, S., Van Hogezand, R., Chalmers, D., Kothe, C., Baert, P., Braakman, T., Schaible, T., Geboes, K., Rutgers, P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: a European multicenter trial. **Gastroenterology.**, 116:1029-1034,1999.
- Dijkstra, G., Moshage, H., van Dullemen, H. M., Jager-Krikken, A., Tiebosch, A. T., Kleibeuker, J. H., *et al.* Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. **J. Pathol.**,186: 416-421, 1998.
- Dixon, D. A. Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. **Curr. Pharm. Des.**, 10, 635-646, 2004.
- Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G.A., Prescott, S. M. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression . The role of the 3'-untranslated region. **J. Biol. Chem.**, 275:11750-11757, 2000.
- Drummond, G. R., Cocks, T. M. Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B₁ and constitutive B₂ kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**,116:24-73-2481, 1995.
- Eglen, R. M. Muscarinic receptor and gastrointestinal tract function. **Life. Sci.**, 68:2573-2578, 2001.
- El Sayah, M., Calixto, J. B. Study of the mechanisms involved in the bradykinin-induced contraction of the pig iris sphincter muscle in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, 458:175-181, 2003a.
- El Sayah, M., Calixto, J.B. New evidence on the mechanisms underlying bradykinin-mediated contraction of the pig iris sphincter in vitro. **Peptides.**, 24:1045-1051, 2003b.

- El Sayah, M., Medeiros, R., Fernandes, E. S., Campos, M. M., Calixto, J. B. Mechanisms underlying up-regulation in the pig Iris sphincter in vitro. **Mol. Pharmacol.**, 69: 1701-1708, 2006.
- Ehrenpreis, E. D., Kane, S. V., Cohen, L. B., Cohen, R. D., Hanauer, S. B. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. **Gastroenterology.**, 117:1271-1277, 1999.
- Erdős, E. G. Some old and some new ideas of kinin metabolism. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15:S20-S24, 1990.
- Farrell, R. J., Pepercorn, M. A. Ulcerative colitis. **Lancet.**, 359:331-340, 2002.
- Feagan, B. G., Rochon, J. Fedorak, R.N., Irvine, J. E., Wild, G., Sutherland, L., *et al.* Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. **N. Engl. J. Med.**, 332:292-297, 1995.
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Campos, M. M., Araújo, J. G. V. C., Pesquero, J. L., Avellar, M. C., Teixeira, M. M., Calixto, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the up-regulation of kinin B₁ receptors in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, 139:973-981, 2003.
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Campos, M. M., de Souza, G. E. P., Fittipaldi, J. F., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M., Calixto, J. B. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B₁ receptor expression. **Br. J. Pharmacol.**, 146:209-216, 2005.
- Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M. A. S., Araújo, R. C., Bader, M., Pesquero, J. B., *et al.* Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B₁ receptor knock-out. **J.Neurosci.**, 25:2405-2412, 2005.
- Ferreira, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops jararaca. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, 24:163-169,1965.
- Ferreira, S. H., Vane, J. R. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. **Brit. J. Pharmacol.**, 30:417-424, 1967.
- Frey, E. K. Zusammenhange zwischen Herzarbeit und Nierentatigkeit. **Arch. Klin.Chir.**, 142: 633-669, 1926.
- Fuller, R. W., Dixon, C. M. S. Cuss, F. M. C. Barnes, P. J. Bradykinin-induced bronchoconstriction in human: mode of action. **Am. Rev. Resp. Dis.**, 135:176-180, 1987.
- Fujino, K., de la Fuentes, S. G., Takami, Y., Takahashi, T., Mantyh, C.R. Attenuation of acid induced oesophagitis in VR-1 deficient mice. **Gut.**, 55:34-40, 2006.
- Gabra, B. H., Couture, R., Sirois, P. Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. **Med. Sci. (Paris).**, 19:1101-1110, 2003.

- Gaginella, T.S., Kachur, J.F. Kinins as mediators of intestinal secretion. **Am. J. Physiol.**, 256: G1-G15, 1989.
- Gama Landgraf, R., Jancar, S., Steil, A. A., Sirois, P. Modulation of allergic and immune complex-induced lung inflammation by bradykinin receptor antagonists. **Inflam. Res.**, 53:78-83, 2004.
- Gaya, D. R., Russel, R.K., Nimmo, E. R., Satsangi, J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex disease? **Lancet.**, 367:1271-1284, 2006.
- Geppetti, P., Patacchini, R., Cecconi, R., Tramontana, M., Meini, S., Romani, A., et al., Effects of capsaicin, tachykinins, calcitonin gene-related peptide and bradykinin in the PSI sphincter muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 341:301-307, 1990.
- Ghosh, S., Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell.**, 109:S81-S96, 2002.
- Girard, P., Pansart, Y., Gillardin, J-M. Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. **Nitric Oxide.**, 13:163-169, 2005.
- Gobeil, F. Jr., Montagne, M., Inamura, N., Regoli, D. Characterization of non-peptide bradykinin B₂ receptor agonist (FR 190997) and antagonist (FR 173657). **Immunopharmacol.**, 43:179-185, 1999.
- Goldhill, J.M., Stojadinovic, A., Kiang, J., Smallridge, R., Shea-Dono-hue, T. Hyperthermia prevents functional, histological and biochemical abnormalities induced during ileitis. **Neurogastroenterol. Mot.**, 11:69-79, 1999.
- Goldstein, D. J., Wang, O., Gitter, B. D., Iyengar, S. Dose-response study of the analgesic effect of lanepitat in patients with painful diabetic neuropathy. **Clin. Neuropharmacol.**, 24: 16-22, 2001.
- Gougat, J., Bernard, F., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J. SSR240612[(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-(((6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl)amino)prpanoyl)amino)-3-(4-([2R,6S)-2,6-dimethylpiperidiny]methyl)phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide Hydrochloride], a New Nonpeptide Antagonist of the Bradykinin B₁ receptor: Biochemical and Pharmacological Characterization. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 309:661-669, 2004.
- Greaves, M. W., Camp, R. D. Prostaglandins, leukotrienes, phospholipase, platelet activating factor and cytoines: an integrated approach to inflammation of human skin. **Arch. Dermatol. Res**, 280:33-41, 1998.
- Griesbacher, T., Amann, R., Sametz, W., Diethart, S., Juan, H. The non-peptide B₂ receptor antagonist FR173657: inhibition of effects of bradykinin related to its role in nociception. **Br. J. Pharmacol.**, 124:1328-1334, 1998.

- Griesbacher, T., Legat, F. J. Effects of the non-peptide B₂ receptor antagonist FR173657 in models of visceral and cutaneous. **Inflammation. Inflamm. Res.**, 49:535-540, 2000.
- Griesbacher, T., Lembeck, F. Analysis of the antagonistic actions of Hoe 140 and other novel bradykinin analogues on the guinea-pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, 211:393-398, 1992.
- Griesbacher, T., Sametz, W., Legat, F. J., Diethart, S., Hammer, S., Juan, H. Effects of the non-peptide B₂ antagonist FR 173657 on kinin-induced smooth muscle contraction and relaxation, vasoconstriction and prostaglandin release. **Br. J. Pharmacol.**, 121:469-476, 1997.
- Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, D. G., Simon, M., Sternweis, P. C., *et al.* Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis by hormones. **J. Biol. Chem.**, 266:20519-20524, 1991.
- Haddad, E. B., Fox, A. J., Rousell, J., Burgess, G., McIntyre, P., Barnes, P. J., Chung, K. F. Post-transcriptional regulation of bradykinin B₁ and B₂ receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone. **Mol. Pharmacol.**, 57:1123-1131, 2000.
- Hall, J. M., Morton, I. K. M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In **The kinin System.**, Farmer, S. G. Ed. Academic Press, 9-43, 1997.
- Hanauer, S. B., Present, D. H. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, 3:81-92, 2003.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., Stephens, L. R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem. Society.**, 34(5):647-662, 2006.
- Hayashi, R., Yamashita, N., Matsui, S., Maruyama, M., Sugiyama, E., Sugiyama, S. Bradykinin stimulates interleukin-8 production by human lung fibroblasts. **Immunology.**, 95, 507-511, 1998.
- Hess, J. F. Molecular pharmacology of kinin receptors. In: **FARMER, S. G. (Ed), The kinin system, London: Academic Press.**, p. 45-55, 1997.
- Hess, J. F., Hey, P. J., Chen, T. B., O'Brien, J., Omalley, S. S., Pettibone, D. J., Chang, R. S. L. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B₁ and B₂ bradykinin receptors. **Biol. Chem.**, 382:123-129, 2001.
- 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.
- Hibi, T., Ogata, H., Sakuraba, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **J. Gastroenterol.**, 37:409-417, 2002.

- Hicks, G. A. TRP channels as therapeutic targets: hot property, or time to cool down? **Neurogastroenterol Motil.**, 18:590-594, 2006.
- Ho, G. T., Soranzo, N., Tenesa, A., Goldstein, D., Satsangi, J. The ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of variants using a gene-wide haplotype tagging approach. **Hum. Mol. Genet.**, 15:797-805, 2006.
- Holzer, P. Implications of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. **Digestion.**, 59:269-283, 1998.
- Hollenbach, E., Vieth, M., Roessner, A., Neumann, M., Malfertheiner, P., Naumann, M. Inhibition of RICK/nuclear factor- κ B and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. **J. Biol. Chem.**, 280: 14981-14988, 2005.
- Hommes, D., van den Blink, B., Plasse, T. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. **Gastroenterology.**, 122:7-14, 2002.
- Huang, T. J., Haddad, E. B., Fox, A. J., Salmon, M., Jones, C., Burgess, G., Chung, K.F. Contribution of bradykinin B₁ and B₂ receptors in allergen-induced bronchial hyperresponsiveness. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 160:1717-1723, 1999.
- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. **Nature.**, 379:821-823, 1996.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, 411:599-603, 2001.
- Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell.**, 80:225-236, 1995.
- Isordia-Salas, I., Pixley, R.A., Li, F., Sainz, I., Sartor, R.B., Adam, A., Colman, R.W. Chronic intestinal inflammation and angiogenesis in genetically susceptible rats is modulated by kininogen deficiency. **Int. Immunopharmacol.**, 2: 1895-105, 2002.
- Iwashita, E., Miyahara, T., Hino, K., Tokunaga, T., Wakisaka, H., Sawazaki, Y. High nitric oxide synthase activity in endothelial cells in ulcerative colitis. **J. Gastroenterol.**, 30:551-554, 1995.
- Jordt, S. E., McKemy, D. D., Julius, D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 13: 487-492, 2003.
- Kamata K, Hayashi I, Mizuguchi Y, Arai K, Saeki T, Ohno T, Saigenji K, Majima M. Suppression of dextran sulfate sodium-induced colitis in kininogen-deficient rats and non-peptide B₂ receptor antagonist-treated rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, 90:59-66, 2002.

- Kim, Y.S., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I. S. The effects of thalidomide on the stimulation of NF- κ B activity and TNF α production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. **Mol. Cells.**, 17:210-216, 2004.
- Kinoshita, K., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Karaki, H. Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca²⁺ channels and its reversal by NF- κ B inhibitors in Crohn's colitis model. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 285: G483-G493, 2003.
- Kraut, H., Frey, E. K., Werle, E. Der Nachweis eines krieslaufhomons in der pankreasdrüse. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, 189:97-106, 1930.
- Krimsky, M. Yedgar, S., Aptekar, L., Schwob, O., Goshen, G., Gruzman, *et al.* Amelioration of TNBS-induced colon inflammation in rats by phospholipase A₂ inhibitor. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 285:G586-G586, 2003.
- Kubes, P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. **Am J. Physiol.**, 262:G1138-G1142, 1992.
- Kubes, P., McCafferty, D-M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am. J. Med.**, 109: 150-158, 2000.
- Kuduk, S. D., Ng, C., Feng, D. M., Wai, J. M., Chang, R. S., Harrell, C. M., *et al.* 2,3-diaminopyridine bradykinin B₁ receptor antagonist. **J. Med Chem.**, 47:6439-6442, 2004.
- Kuebler, J. F., Schremmer-Danninger, E., Bhoola, K. D., Roscher, A. A., Messmer, K., Hoffmann, T. F. Kinin B₁ receptor in ischaemia-induced pancreatitis functional importance and cellular localization. **Biol. Chem.**, 384:1311-1319, 2003.
- Kyle, D. J., Martin, J. A., Farmer, S. G., Burch, R. M. Design and conformational analysis of several highly potent bradykinin receptor antagonist. **J. Med. Chem.**, 34:1230-1233,1991.
- Lagneux, C., Bader, M., Pesquero, J. B., Demenge, P., Ribout, C. Detrimental implication of B₁ receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. **Int. Immunopharmacol.**, 2:815-822, 2002.
- Lagneux, C., Ribout, C. *In vivo* evidence for B₁-receptor synthesis induction by heat stress in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 121:1045-1046, 1997.
- Lakatos, P. L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel disease: up or down? **World. J. Gastroenterol**, 14: 6102-6108, 2006.
- Landgraf, R. G., Sirois, P., Jancar, S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B₁ and B₂ selective receptor antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, 460:75-83, 2003.

- Lennard, L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 43:329-339, 1992.
- Larrivé, J.F., Bachvarov, D.R., Houle, F., Landry, J., Hout, J., Marceau, F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B₁ receptors induced by tissue injury. **J. Immunol.**, 160: 1419-1426, 1998.
- Lasa, M., Brook, M., Saklatvala, J., Clark, A. R. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. **Mol. Cell. Biol.**, 21, 771-780, 2001.
- Lecci, A., Meini, S., Patacchini, R., Tramontana, M., Giuliani, S., Criscuoli, M., *et al.* Effect of dexamethasone on cyclophosphamide-induced cystitis in rats : lack of relation with bradykinin B₁ receptor-mediated motor responses. **Eur. J. Pharmacol.**, 369:99-106, 1999.
- Lecci, A., Santicioli, P., Maggi, C. A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 2:630-641, 2002.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L. International union of pharmacology.XLV.Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.**, 57:27-77, 2005.
- Lerebours, E., Gower-Rousseau, C., Merle, V., Brazier, F., Debeugny, S., Marti, R., *et al.* Stressful live events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: a population-based case control study. **Am. J. Gastroenterol.**, Nov.13, 2006.
- Lewis, G.P. Plasma kinin and other vasoactive compounds in acute inflammation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 116:847-854, 1964.
- Li, Q., Verma, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, 2:725-734, 2002.
- Lichtenstein, G. R., Abreu, M. T., Cohen, R., Tremaine, W. American gastroenterological association institute technical review on corticoids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.**, 130:940-987, 2006.
- Liebmann, C., Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. **Biol. Chem.**, 382: 49-55, 2001.
- Liebmann, C., Böhmer F. D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. **Curr. Med. Chem.**, 7: 911-943, 2000.
- Lowry, P.W., Weaver, A. L., Tremaine, W. J., Sandborn, W. J. Combination therapy with oral tacrolimus (FK506) and azathioprine or 6-mercaptopurine for treatment-refractory Crohn's disease perianal fistulae. **Inflam. Bowel. Dis.**, 5: 239-245, 1999.

- Luccarini, J.M., Belichard, P., Defrene, E., Faye, P., Franck, R.M., Duclos, H., Paquet, J. L., Pruneau, D. Induction of kinin B₁ receptors in the rat urinary bladder of cyclophosphamide-treated rats. **The 15th International Conference on kinins.**, Nara, Japan, October, 19-24, 1998.
- Lundberg, J. O.N., Hellstrom, P. M., Lundberg, J. M., Alving, K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. **Lancet.**, 344:1673-1674,1994.
- Maas, J. Rae, G. A., Huidobro-Toro, J. P., Calixto, J. B. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1471-1477, 1995.
- MacCafferty, D., Miampamba, M., Sihota, E., Sharkey, K.A., Kubes, P. Role of inducible nitric oxide sintase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. **Gut.**, 45:864-873,1999.
- MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., *et al.* Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell.**,81:641-650, 1995.
- MacNeil, T., Bierillo, K.K., Menke, J. G., Hess, J. F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. **Biochim. Biophys. Acta. Gene. Struct. Express.**, 1264:223-228, 1995.
- Mannon, P. J., Fuss, I. J., Mayer, L., Elson, C. O., Sandborn, W. J., Present, D., *et al.* Anti-Interleukin-12-antibody for active Crohn's disease. **N. Engl. J. Med.**, 351: 2069-2079, 2004.
- Marceau, F. Kinin B₁ receptors: a review. **Immunopharmacol.**, 30:1-26,1995.
- Marceau, F., Bachvarov, D.R. Kinin receptors. **Clin Rev Aller 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., Larrivée, J. F., Saint-Jacques, E., Bachvarov, D. R. The kinin B₁ receptor: an inducible G protein coupled receptor. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 75:725-731,1997.
- Marceau, F., Regoli, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. **Nat. Rev. Drug. Discovery.**, 3:845-852, 2004.
- Martinolle, J.P., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., Bueno, L. Altered contractility of circular and longitudinal muscle in TNBS-inflamed guinea pig ileum. **Am. J. Physiol.**, 272:G1258-G1267, 1997.
- Mathis, S. A., Criscimagna, N. L., Leeb-Lundberg L. M. F. B₁ e B₂ kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol.**, 50:128-139, 1996.

- Mattos, W. M., Campos, M. M., Fernandes, E. S., Richetti, G. P., Niero, R., Yunes, R. A., *et al.* Anti-edematogenic effects of velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*: evidence for a selective inhibition of kinin B₁ receptor-mediated responses. **Regul. Pept.**, 136:98-104, 2006.
- Mattos, W. M., Ferreira, J., Richetti, G. P., Niero, R., Yunes, R. A., Calixto, J. B. Antinociceptive properties produced by the pregnane compound velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*. **Neuropeptides.**, 40:125-132, 2006.
- Mazenot, C., Loufrani, L., Henrion, D., Ribuot, C., Muller-Esterl, W., Godin-Ribuot, D. Endothelial kinin B₁ receptors are induced by myocardial ischemia-reperfusion in the rabbit. **J. Physiol.**, 530:69-78, 2001.
- McEachern, A. E., Shelton, E. R., Bhajta, S., Obernolt, R., Bach, C., Zuppan, P., *et al.* Expression cloning of rat B₂ bradykinin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 88:7724-7728, 1991.
- McLean, P.G., Ahluwalia, A., Perretti, M. Association between kinin B₁ receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **J. Exp. Med.**, 192:367-380, 2000.
- McLean, P.G., Perretti, M. Ahluwalia, A. Inducible expression of the kinin B₁ receptor in the endotoxic heart: mechanisms of des-Arg⁹-bradykinin-induced coronary vasodilatation. **Br. J. Pharmacol.**, 128: 275-282, 1999.
- McNaughton, N. C. L., Randall, A. D., Electrophysiological properties of the human N-type Ca⁺² channel: channel gating in Ca⁺², Ba⁺² and Sr⁺² containing solutions. **Neuropharmacol.**, 36: 895-915, 1997.
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Calixto, J. B. The in vivo and ex vivo roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor-κB and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor mediated contraction of the rabbit aorta **Regul. Pept.**, 97:121-130, 2001.
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A. S., Pesquero, J. B., *et al.* Bradykinin B₁ receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-κB signaling pathways. **Circ. Res.**, 94:1375-1382, 2004.
- Medeiros, Y., Calixto, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the biphasic responses to bradykinin in circular muscle from guinea pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, 241:157-163, 1993.
- Menke, J. G., Borowski, J. A., Bierilko, K. K., Macneil, T., Derric, A. W., Scheneck, K. A., Ransom, R. W., Strader, S. D., Linemeyer, D. L., Hess, J. F. Expression of cloning of a human B₁ bradykin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269:21583-21586, 1994.
- Miller, M. J. S., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. **J. Pharm. Exp. Ther.**, 264:11-16, 1993.

- Modéer, T., Anduren, L., Yucel-Lindberg, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumour necrosis factor alpha. **Cytokine.**, 10:26-31, 1998.
- Moncada, S. The L-arginine: oxide pathway. **Acta Physiol Scand.**,145:201-227,1992.
- Moreira, A. L., Sampaio, E. P., Zmuidzimas, A., Frindt, P., Smith, K., Kaplan, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, 177:1675-1680, 1993.
- Moriarty, D., Goldhill, J., Selve, N., O'Donoghue, D. P., Baird, A. W. Human colonic anti-secretory activity of the potent NK1 antagonist SR 140333: Assessment of potential anti-diarrhoeal activity in food allergy and inflammatory bowel disease. **Br. J. Pharmacol.**, 133: 1346-1354, 2001.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depev, W. T., Szewczuk, M. R., Wallace, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology.**, 96:795-803, 1989.
- Mulè, F., Zizzo, M. G., Amato, A., Feo, S., Serio, R. Evidence for a role of inducible nitric oxide synthase in gastric relaxation of *mdx* mice. **Neugastroenterol. Motil.**, 18:446-454, 2006.
- Musch, M. W., Miller, R. J., Field, M., Siegel, M. I. Stimulation of colonic secretion by lipoyxygenase metabolites of arachidonic acid. **Science.**, 217: 1255-1256, 1982.
- Myers, B. R., Julius, D. TRP channel structural biology: New roles for an old fold. **Neuron.**, 54:847-850, 2007.
- Nathan, C., Xie, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell.**, 78:915-918, 1994.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. **Nature.**, 446:557-561, 2007.
- Neurath, M. F. IL-23: a master regulation in Crohn disease. **Nature. Med.**, 13:26-28, 2007.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stüber, E., Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J. Exp. Med.**, 182:1281-1290, 1995.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Schurmann, G., Pettersson, S., Arnold, K., Muller-Lobeck, H., Strober, W., Herfarth, C., Buschenfelde, K. H. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 859:149-159, 1998.

- Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer, Z., Buschenfelde, K. H., Strober, W. Local administration of antisense phosphothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogates established experimental colitis in mice. **Nat. Med.**, 2: 998-1004, 1996.
- Ni, A., Chao, L., Chao, J. Transcription factor nuclear factor-kB regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. **J. Biol. Chem.**, 273: 2784-2791, 1998.
- Ogata, H., Hibi, T. Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. **Curr. Pharm. Des.**, 9: 1107-1113, 2003.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Nunez, G. NOD2, a NOD1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. **J. Biol. Chem.**, 276:4812-4818,2001.
- Ohashi, P.S., Woodgett, J.R. Modulating autoimmunity: pick your PI3 kinase. **Nat. Med.**, 11(9): 294-295, 2005.
- Ondetti, M. A., Rubin, B., Cushman, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensina-converting enzyme: a new class of orally active antihypertensive agents. **Science.**, 196:441-444, 1977.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O. H., Sorensen, I. A., Binder, V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. **New. Engl. J. Med.**, 324: 84-88,1991.
- Pan, Z. K., Ye, R. D., Christiansen, S.C., Jagels, M.A., Bokoch, G. M., Zuraw, B. L. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kB activation and IL-1 β gene expression in cultured human epithelial cells. **J. Immunol.**, 160:3038-3045, 1998.
- Papadimitriou, J. C., Cangro, C. B., Lustberg, A., Khaled, A., Nogueira, J., Wiland, A., *et al.* Histologic features of mycophenolate mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. **Int. J. Surg. Pathol.**, 11:295-302, 2003.
- Passos, G. F., Fernandes, E. S., Campos, M. M., Araújo, J. G. V. C., Pesquero, J. L., Souza, G. E. P., Avellar, M. C. W., Teixeira, M. M., Calixto, J. B. Kinin B₁ receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **J. Immunol.**, 172: 1839-1847, 2004.
- Pesquero, J. B., Araujo, R. C., Heppentall, P. A., Stucky, C. L., Silva JR, J. A., Walther, T., *et al.* Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97: 8140-8145, 2000.
- Pesquero, J. B., Pesquero, J. L., Oliveira, S. M., Roscher, A. A., Metzger, R., Ganten, D., Bader, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B₁ receptor gene. **Biochem. Biophys.**, 220:219-225,1996.

- Phagoo, S. B., Poole, S., Leeb-Lundberg, L. M. F. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblast. **Mol. Pharmacol.**, 56:325-333, 1999.
- Phagoo, S.B., Yaqoob, M., Herrera-Martinez, E., McIntyre, P., Jones, C., Burgess, G.M. Regulation of bradykinin receptor gene expression in human lung fibroblasts. **Eur. J. Pharmacol.**, 397:237-246, 2000.
- Podolsky, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, 347:417-429, 2002.
- Porreca, F., Vanderah, T.W., Guo, W., Barth, M., Dodey, P., Peyrou, V., *et al.* Antinociceptive pharmacology of LF22-0542, a novel non-peptidic bradykinin B₁ receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 318: 195-205, 2006.
- Praddaude, F., Tack, I., Emond, C., Bscands, J.L., Girolami J, P., Tran-Van, T., *et al.* In vivo and in vitro homologues desensitization of rat glomerular bradykinin B₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, 294:173-182, 1995.
- Prado, G.N., Mierke, D. F., LeBlanc, T., Manseau, M., Taylor, L., Yu, J., Zhang, R., Pal-Ghosh, R., Polgar, P. Role of hydroxyl containing residues in the intracellular region of rat bradykinin B(2) receptor in signal transduction, receptor internalization, and resensitization. **J. Cell. Biochem.**, 83:435-447, 2001.
- Prado, G.N., Taylor, L., Polgar, P. Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B₂ receptor. **J. Biol. Chem.**, 272:14638-14642, 1997.
- Prado, G. N., Taylor, L., Zhou, Xiaofeng, Z., Ricupero, D., Mierke, D. F., Polgar, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. **J. Cell. Physiol.**, 193: 275-286, 2002.
- Proud, D., Kaplan, A. P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Annu. Rev. Immunol.**, 6, 49-83, 1988.
- Qiu, B. S., Vallance, B. A., Blennerhassett, P. A., Collins, S. M. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. **Nat. Med.**, 5:1178-1182, 1999.
- Rashid, M. H., Inoue, M., Matsumoto, M., Ueda, H. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 308: 1158-1164, 2004.
- Rees, D. D., Palmer R, M., Schulz, R., Hodson, H. F., Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol.**, 101:746-752, 1990.
- Regoli, D., Allogho, S. N., Rizzi, A., Gobeil, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, 348:1-10, 1998.

- Regoli, D., Barabé, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32:1-45,1980.
- Regoli, D., Barabé, J., Park, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 55:855-867, 1977.
- Rejdak K, Rejdak R, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, Grieb P. 2-Deoxyglucose enhances epileptic tolerance evoked by transient incomplete brain ischemia in mice. **Epilepsy Res.**, 43:271-278, 2001.
- Reynolds, C.J., Togliias, A., Proud, D. Airway neural responses to kinins: a tachyphylaxis and role of receptor subtypes. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, 159: 431-438, 1999.
- Ribbons, K. A., Zhang, X-J., Thompson, J. H. Potential role of nitric oxide in a chronic model of colitis in rhesus macaques. **Gastroenterology.**, 108:705-711,1995.
- Ritchie, T. J., Dziadulewicz, E. K., Culshaw, A.J., Müller, W., Burgess, G.M., Bloomfield, G. C., *et al.* Potent and orally bioavailable non-peptide antagonist at the human bradykinin B(1) receptor based on a 2-alkylamino-5-sulfamoylbenzamide core. **J. Med. Chem.**, 47:4642-4644, 2004.
- Rocha, A. C. C., Fernandes, E. S., Passos, G. F., Calixto, J. B., Campos, M. M. Assessment up-regulation of kinin B₁ receptors in the mouse paw after treatment with LPS. **J. Int. Immunopharmacol.**, 11:1593-1600, 2005.
- Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., Rosenfeld, G. Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, 156:261-273, 1949.
- Rodrigues, G. B., Passos, G. F., Di Giunta, G., Figueiredo, C. P., Rodrigues, E.B., Grumman, A., *et al.* Preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of systemic and topical thalidomide on endotoxin-induced uveitis in rats. **Exp Eye Res.**, 84:553-560, 2007.
- Rogler, G., Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. **World J. Surg.**, 22:382-389, 1998.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., *et al.* Nuclear factor κB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. **Gastroenterology.**, 115:357-369, 1998.
- Rothe, H., Ongören, C., Rösen, P., Kolb, H. Genetic analysis of aberrant tumor necrosis factor alpha production in prediabetic BB-rats. **Transplant Proc.**, 25:2833-2834, 1993.
- Rutgeerts, P., Feagan, B. G., Lichtenstein, G. R., Mayer, L. F.,Schreiber, S., Colombel, J.F., *et al.* Comparison of schedule and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. **Gastroenterology.**, 126:402-413, 2004.

- Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D. R., Marceau, F. Agonist-induced translocation of the kinin B₁ receptor to caveolae-related rafts. **Mol. Pharmacol.**, 61:546-553, 2002.
- Sardi, S. P., Errasti, A. E., Rey-Ares, V., Rogines-Vello, 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.
- Sardi, S. P., Perez, H., Antunez, P., Rothlin, R. P. Bradykinin B₁ receptors in human umbilical vein. **Eur. J. Pharmacol.**, 321:33-38, 1997.
- Sasaki, M., Bharwani, S., Jordan, P., Elrod, J.W., Grisham, M. B., Jackson, T.H., Lefer, D.J., Alexander, J.S. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. **Free. Radic. Biol. Med.**, 35:1679-1687, 2003.
- Sawutz, D. G., Salvino, J. M., Dolle, R. E., Casiano, F., Ward, S. J., Houck, W. T., Faunce, D. M., Douty, B. D., Baizaman, E., Awad, M. M. A., Marceau, F. The non-peptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 91:4693-4697, 1994.
- Schachter, M., Peret, M.W., Billing, A.G., Wheeler, G.D. Immunolocalization of the protease kallikrein in the colon. **J. Histochem. Cytochem.**, 31:1255-1260, 1983.
- Schachter M, Longridge DJ, Wheeler GD, Mehta JG, Uchida Y. Immunocytochemical and enzyme histochemical localization of kallikrein-like enzymes in colon, intestine, and stomach of rat and cat. **J. Histochem. Cytochem.**, 34:927-934, 1986.
- Schanstra, J. P., Arlic, C., Marin-Castano, M. B., Girolami, J., Bascands, J. Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. **Int. J. Mol. Med.**, 3:185-191, 1999.
- Schanstra, J.P., Bataillé, E., Marin Castano, M.E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J.B., *et al.* The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-κB and induces homologous upregulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. **J. Clin. Invest.**, 101:2080-2091, 1998.
- Scherrer, D., Schmidlin, F., Haddad, E., Kassel, O., Landry, Y., Gies, J. Glucocorticoids increase bradykinin B₂ receptor gene transcription in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. **Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.**, 359:153-159, 1999.
- Schlemper, V., Medeiros, R., Ferreira, J., Campos M.M., Calixto, J. B. Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact trachea *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 145:740-750, 2005.
- Schottenfeld, D., Beebe-Dimmer, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **CA Cancer. J. Clin.**, 56:69-83, 2006.

- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. **Gut.**, 42:477-485, 1998.
- Sen, R., Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell.**, 46:705-716, 1986.
- Sher, M. E., Bank, S., Greenberg, E. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. **Inflamm. Bowel. Dis.**, 5:73-78, 1999.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., Blankenstein, M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the european collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD1). **Gut.**, 39:690-697, 1996.
- Shi, X. Z., Sarna, S. K. Differential inflammatory modulation of canine ileal longitudinal and circular muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 277:G341-G350, 1999.
- 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.
- Skagen, D. W e Andersen, K. L. Intestinal kallikrein activity is reduced in a bypassed segment of the small intestine in the rat. **Comp. Biochem. Physiol.**, 84:175-180, 1986.
- Smith, J. A. M., Webb, C., Holford, J., Burguess, G. M. Signal transduction pathways for B₁ and B₂ bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. **Mol. Pharmacol.**, 47:525-534, 1995.
- Souza, D. G., Lomez, E. S. L., Pinho, V., Pesquero, J. B., Bader, M., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M. Role of bradykinin B₂ and B₁ receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. **J. Immunol.**, 172:2542-2548, 2004.
- Spencer, N. J., Hennig, G. W., Smith, T.K. Electrical rhythmicity and spread of action potentials in longitudinal muscle of guinea-pig distal colon. **Am. J. Physiol. Gastrointestinal. Liver. Physiol.**, 282:G904-G917, 2002.
- Stadnicki, A. Tissue and plasma kallikrein in inflammatory bowel disease. **Dig. Liver. Dis.**, 37:665-673, 2005.
- Stadnicki, A., DeLa Cadena, R.A., Sartor, R.B., Bender, D., Kettner, C.A., Rath, H.C., Adam, A., Colman, R.W. Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in Lewis rat. **Dig. Dis. Sci.**, 41: 912-920, 1996.
- Stadnicki, A., Mazurek, U., Gonciarz, M., Plewka, D., Nowaczyk, G., Orchel, J., *et al.* Immunolocalization and expression of kallistatin and tissue kallikrein in human inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, 48:615-623, 2003.

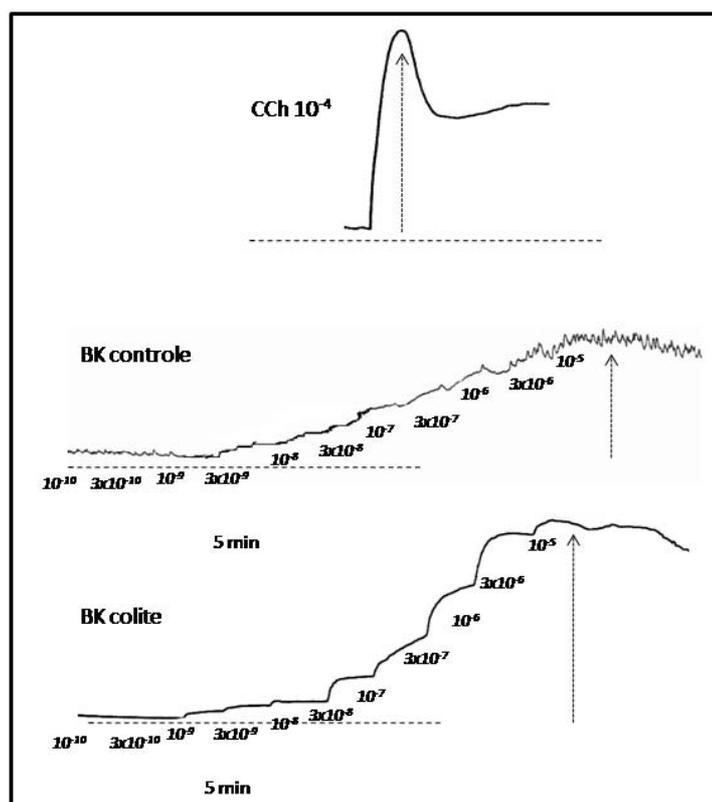
- Stadnicki, A., Pastucha, E., Nowaczyk, G., Mazurek, U., Plewka, D., Machnik, G., *et al.* Immunolocalization and expression of kinin B₁R and B₂R receptors in human inflammatory bowel disease. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 289:361-366, 2005.
- Stadnicki, A., Sartor, R. B., Janardham, R., Stadnicka, I., Adam, A., Blais, C., *et al.* kallikrein-kininogen system activation and bradykinin (B₂) receptors in indomethacin-induced enterocolitis in genetically susceptible Lewis rat. **Gut.**, 43:365-374, 1998.
- Steed, P. M., Tansey, M. G., Zalevsky, J., Zhukovsky, E. A., Desjarlais, J.R., Szymkowski, D. E., *et al.* Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. **Science.**, 301:1895-1898, 2003.
- Steranka, L. R., Manning, D. C., Dehaas C, J., Ferkany, J. W., Borosky, S. A., Connor, J. R., *et al.* Bradykinin as a pain mediator: receptor are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl Acad Sci USA.**, 85:3245-3249, 1988.
- Stewart, J. M. Bradykinin antagonists as anti-cancer agents. **Curr. Pharm. Des.**, 9:2036-2042, 2003.
- Stewart, J. M., Gera, L., York, E. J., Chan, D. C., Bunn, P. Bradykinin antagonist: present progress and future prospects. **Immunopharmacology.**, 43:155-161, 1999.
- Stoll, M., Corneliussen, B., Costello, C. M. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. **Nat. Genet.**, 36:476-480, 2004.
- Storr, M. TRPV1 in colitis: is it a good or a bad receptor? - a view point. **Neurogastroenterol. Motil.**, doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00946.x
- Stucchi, A. F., Shofer, S., Leeman, S., Materne, O., Beer, E., Mc Clug, J., *et al.* NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. **Am. J. Physiol.**, 279:G1298-306, 2000.
- Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K. M., Glazier, K. D., Golijanin, D., *et al.*, Microsomal prostaglandin E synthase-1 overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. **J. Biol. Chem.**, 279:12647-12658, 2004.
- Tanaka, H.K., Watanabe, K., Tamaru, N., Yoshida, M. Arachidonic-acid metabolites and glucocorticoid regulatory mechanism in cultured porcine tracheal smooth-muscle cells. **Lung.**, 173:347-361, 1995.
- Taub, J. S., Guo, R., Leeb-Lundberg, L. M., Madden, J. F., Daaka, Y. Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. **Cancer. Res.**, 63:2037-2041, 2003.

- Theis, M. K., Boyko, E.J. Patient perception of causes of inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 89:1920,1994.
- Todorov, A. G., Andrade, D., Pesquero, J. B., Araújo, R. de C., Bader, M., Stewart, J. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B₁/B₂) subtypes. **FASEB. J.**, 17:73-75, 2003.
- Tonini, M., Spelta, V., De Ponti, F., De Giorgio, R., D'Agostino, G., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Sternini, C., Crema, F. Tachykinin-dependent and independent components of peristalsis in the guinea-pig distal colon. **Gastroenterology.**, 120:938-945, 2001.
- Trevisani, M., Schmidlin, F., Tognetto, M., Nijkamp, F.P., Gies, J.P., Frossard, N., Amadesi, S., Folkerts, G., Geppetti, P. Evidence for in vitro expression of B₁ receptor in the mouse trachea and urinary bladder. **Br. J. Pharmacol.**, 126:1293-1300, 1999.
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., Floderus-Myrhed, B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. **Gut.**, 29:990-996, 1988.
- Van Rossum, J. M. Cumulative dose-response curves. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, 143:299-330,1963.
- Vane, J., Botting, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB. J.**, 1:89-96, 1987.
- Varghese, A. K., Verdú, E. F., Bercik, P., Klan, W. I., Blennerhassett, P. A., Szechtman, H., Collins, S. M. Antidepressants attenuates increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. **Gastroenterology.**, 130:1743-1753, 2006.
- Vauquelin, G., Szczuka, A. Kinetics versus allosteric mechanisms to explain insurmountable antagonism and delayed ligand dissociation. **Neurochem. Int.**, doi:10.1016/j.neuint.2007.05.005.
- Vavrek, R., Stewart, J. M. Copetitive antagonist of bradykinin. **Peptides.**, 6:161-164,1985.
- Vianna, R. M., Ongali, B., Regoli, D., Calixto, J. B., Couture, R. Up-regulation of kinin B₁ receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. **Br. J. Pharmacol.**, 138:13-22, 2003.
- Waetzig, G. H., Schreiber, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation – targeting ancient pathways to treat modern diseases. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 18:17-32, 2003.

- Waetzig, G. H., Seegert, D., Nikolaus, S., Rosenstiel, P., Sfikas, N., Schreiber, S. Differential activity and expression of mitogen-activated protein kinases in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology (abstract)**., 120, 2001.
- Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., Schreiber, S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. **J. Immunol.**, 168:5342-5351, 2002.
- Wallace, J. L., Ma, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp. Biol. Med (Maywood)**., 226:1003-1015, 2001.
- Wallace, J. M., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., Beck, P. L. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in rat model of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**., 96(1):29-36, 1989.
- Wardle, T. D., Hall L, Turberg, L. A. Inter-relationships between inflammatory mediators released from colonic mucosa in ulcerative colitis and their effects on colonic secretion. **Gut**., 34: 503-508, 1993.
- Watanabe, M., Yoshihara, S., Abe, T., Oyama, M., Arisaka, O. Effects of the orally active non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist FR173657, on plasma extravasation in guinea-pig airways. **Eur. J. Pharmacol.**, 367:373-378,1999.
- Werle, E., Götze, W., Kepper, A. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten darm und über eine neue darmkontrahierende substanz. **Biochem. Z.**, 289:217-233, 1937.
- Werle, E., Maier, L. Über die chemische und pharmakologische unterscheidung von kallikrein verschieden herkunft. **Biochem. Z.**, 323:279-288, 1952.
- Wood, M. R., Kim, J. J., Han, W., Dorsey, B. D., Hommick, C. F., DiPardo, R. M., et al. Benzodiazepines as potent and selective bradykinin B₁ antagonists. **J. Med. Chem.**, 46:1803-1806, 2003.
- Wurzelmann, J. L., Lyles, C. M., Sandler, R. S. Childhood infection and the risk of inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, 39: 555-560,1994.
- Yang, V.W. Eicosanoids and inflamatory bowel disease. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, 125:317-332, 1996.
- Yang, X., Taylor, L., Polgar, P. Mechanisms in the transcription regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. **J. Biol. Chem.**, 273:10763-10770, 1998.
- Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N. H., Chan, C. L., Knowles, C., Williams, N.S., et al. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. **Lancet**., 357:1338-1339, 2001.

- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., *et al.* Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis. **Nature.**, 446:552-556, 2007.
- Zeitlin, I. J., Smith, A. N. Mobilization of tissue kallikrein in inflammatory disease of the colon. **Gut.**, 14:133-138, 1973.
- Zhang, Y., Adner, M., Cardell, L. O. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in vitro model of chronic airway inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 489:117-126, 2004.
- Zhou, X., Polgar, P., Taylor, L. Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulation in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. **Biochem. J.**, 330:361-366, 1998.
- Zhou, W., Prado, G. N., Chai, M., Yang, X., Tailor, L., Polgar, P. Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B₁ receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'-untranslated region. **Mol. Cell. Biol. Res. Commun.**, 1:29-35, 1999.
- Zingarelli, B., Szabo, C., Salzman, A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. **Gut.**, 45:199-209, 1999.

Registro típico ilustrando a viabilidade testada na adição de CCh e curvas concentração-resposta cumulativas para BK em cólon controle (sem colite) ou obtido 72h após a indução da colite por TNBS.



Hara, D. B., Fernandes, E. S., Campos, M. M., Calixto, J. B. Pharmacological and biochemical characterization of bradykinin B₂ receptors in the mouse colon: Influence of the TNBS-induced colitis. **Reg. Pep.**, 141:25-34, 2007.