

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

**ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO
DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR B₁ PARA AS
CININAS**

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

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

Florianópolis – SC
Fevereiro/2001

CABRINI, Daniela de Almeida. ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR B₁ PARA AS CININAS. Florianópolis, 2001. 130 p. Dissertação (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

Defesa: 23/02/2001-08-18

O presente estudo avaliou, através de técnicas moleculares e farmacológicas, o efeito dos glicocorticóides endógenos sobre a expressão do receptor B₁ em ratos. Também foi investigado alguns dos mecanismos envolvidos na indução do receptor B₁ para as cininas na aorta isolada de coelhos. Foram obtidas evidências moleculares e farmacológicas adicionais indicando que a expressão do receptor B₁ para as cininas, a qual pode ser regulada pelos glicocorticóides endógenos através de mecanismo dependente da ativação da via do NF-κB. Além disso, a indução tempo-dependente da contração mediada pela des-Arg⁹-BK na aorta de coelho envolve a ativação da proteína quinase C, da tirosina quinase, com a participação da cyclooxygenase-2 e também da via do NF-κB. Os resultados obtidos com o presente estudo sugerem uma importante participação dos receptores B₁ para as cininas mediando respostas inflamatórias. Além disso, sugerem ainda que pelo menos parte das ações antiinflamatórias dos glicocorticóides pode estar associado com a regulação dos receptores B₁ para as cininas.

Cininas, receptor B₁, des-Arg⁹-bradicinina, glicocorticóides endógenos, proteína quinase C, tirosina quinase, fator nuclear-κB, Ciclooxygenase-2, ratos, coelhos.

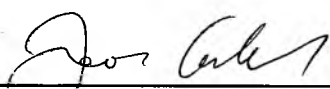

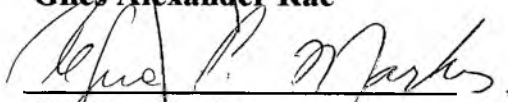
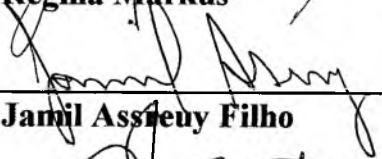
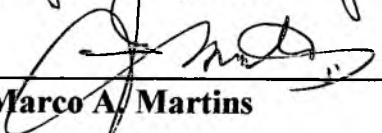
**“ESTUDOS FARMACOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DO RECEPTOR B₁ PARA AS CININAS”**

POR

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

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

Banca Examinadora:

 _____ João B. Calixto	FMC/UFSC-(Orientadora)
 _____ Giles Alexander Rae	FMC/UFSC
 _____ Regina Markus	IB -USP
 _____ Jamil Assreuy Filho	FMC/UFSC
 _____ Marco A. Martins	FIOCRUZ - RIO

**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2001.

ORIENTADOR

Prof. Dr. João Batista Calixto

Esta Tese foi realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, nos laboratórios da Prof^a. Maria Cristina Avellar no Departamento de Farmacologia - Setor de Endocrinologia Experimental - e do Prof. João Bosco Pesquero no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (SP) - durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia, nível Doutorado, com o auxílio financeiro da CAPES.

"SOMOS RESPONSÁVEIS POR
AQUILO QUE FAZEMOS, O QUE NÃO FAZEMOS E O QUE
IMPEDIMOS DE FAZER."

ALBERT CAMUS

"QUALQUER COISA QUE VOCÊ POSSA FAZER OU
SONHAR, VOCÊ PODE COMEÇAR. A CORAGEM CONTÉM
EM SI MESMA O PODER, O GÊNIO E A MAGIA."

GOETHE

"YESTERDAY IS BUT A DREAM, TOMORROW IS BUT A
VISION. TODAY WELL LIVED MAKES EVERY YESTERDAY A
DREAM OF HAPPINESS AND EVERY TOMORROW A VISION
OF HOPE. LOOK WELL, THEREFORE, TO THIS DAY."

PROVÉRBO SÂNSCRITO

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Este trabalho é dedicado especialmente aos meus pais, Maria Inês e Divanil Octávio Cabrini, por nunca duvidarem da minha capacidade e por me incentivarem e apoiarem sempre, sem nunca questionarem as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

- ↪ Especialmente ao meu orientador João B. Calixto, por me ensinar a ser pesquisadora e a admirar a profissão que escolhi, por ser um verdadeiro exemplo de profissional.
- ↪ Aos professores João B. Pesquero e Maria Cristina Avellar e seus alunos, pela acolhida, pela paciência e atenção dispensadas.
- ↪ Aos demais professores do departamento.
- ↪ Aos grandes amigos que fiz, esperando que a distância nunca nos separe.
- ↪ À Karla Tratsk, Maria Martha Campos e Rodrigo Medeiros por auxiliarem nos experimentos.
- ↪ Aos funcionários do Departamento,
- ↪ À CAPES pelo auxílio financeiro

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Lista de abreviações	i
Lista de figuras	iii
Resumo	v
Abstract	viii
Publicações	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais	25
3.2. Supressão de corticóides endógenos	25
3.2.1. Adrenalectomia	25
3.2.2. Tratamento com mitotano	26
3.3. Castração	26
3.4. Edema de pata de rato	27
3.5. Veia porta de rato	27
3.6. Influência do tratamento de ratos ADX com inibidores	29
3.7. Influência da adrenalectomia na resposta adematogênica induzida pela carragenina ou pela dextrana	30
3.8. Ensaio da mobilidade por deslocamento em gel para o NF- κ B	31
3.9. Ensaio de proteção à ribonuclease	33
3.10. Aorta isolada de coelho	34

3.11. Influência de inibidores da COX, do NF- κ B e de proteínas quinases sobre o aumento da resposta dependente do tempo ao agonista B ₁	35
3.12. Efeito de algumas drogas sobre a indução <i>in vivo</i> do receptor B ₁ em decorrência do tratamento com LPS	37
3.14. Análise estatística	38
3.15. Drogas e reagentes	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Indução do receptor B ₁ após a adrenalectomia dos animais	40
4.2. Efeitos da adrenalectomia sobre a expressão do RNA para o receptor B ₁ no pulmão de ratos	47
4.3. Influência da adrenalectomia sobre o edema induzido por outros agentes inflamatórios	49
4.4. Envolvimento da COX e do fator de transcrição NF- κ B na indução do receptor B ₁ em animais ADX	50
4.5. Ensaio de deslocamento em gel com o oligonucleotídeo consenso para o NF- κ B	54
4.6. Indução do receptor B ₁ por incubação <i>in vitro</i> da aorta isolada de coelhos	56
4.7. Indução do receptor B ₁ pelo tratamento de coelhos com LPS.....	65
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

ABREVIACÕES.

BK	Bradicinina
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
NO	Óxido nítrico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
COX	Ciclooxigenase
PG	Prostaglandina
IL-1 β	Interleucina-1 β
NF- κ B	Fator nuclear-kappaB
TNF α	Fator de necrose tumoral α
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
NA	Noradrenalina
LPS	lipopolissacarídeos
ADX	Adrenalectomizado
FO	Falso operado
PBS	Salina tamponada com fosfato
RPA	Ensaio de proteção a ribonuclease
JNK	Tirosina quinase janus quinase
SNC	Sistema nervoso central
FLC	Fator liberador de corticotrofina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CREB	Elemento de resposta ao AMPc

NPV Núcleo paraventricular
iNOS Óxido nítrico sintase induzida

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Efeito da adrenalectomia sobre a resposta ao receptor B ₁ em ratos.	42
Figura 2 – Efeito do tempo de cirurgia sobre a resposta edematogênica ao agonista seletivo B ₁ , a des-Arg ⁹ -BK.	44
Figura 3 – Efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores das cininas no edema de pata induzido pelo agonista B ₁ em ratos ADX.....	45
Figura 4 – Efeito do tratamento com mitotano sobre a resposta ao agonista do receptor B ₁ , a des-Arg ⁹ -BK.	46
Figura 5 – Quantificação do RNA do receptor B ₁ em pulmão de ratos adrenalectomizados.....	48
Figura 6 – Influência da adrenalectomia no edema de pata induzido pela carragenina ou pela dextrana.	49
Figura 7 – Efeito dos inibidores da COX sobre a resposta edematogênica causada pelo agonista B ₁ em animais ADX.	50
Figura 8 – Influência do tratamento dos animais ADX com dexametasona e com o inibidor do NF-κB.	52
Figura 9 – Efeito sinérgico entre a dexametasona e o inibidor do NF-κB o aumento da resposta ao receptor B ₁ em animais ADX.....	53
Figura 10 – Detecção da ativação do fator de transcrição NF-κB pela adrenalectomia em ratos.	55
Figura 11 – Efeito dos inibidores da COX-2 sobre a indução do receptor B ₁ causado pela incubação <i>in vitro</i> de anéis de aorta de coelho.....	57

Figura 12 – Efeito de inibidores da ativação de proteínas quinases sobre a indução do receptor B ₁ causado pela incubação <i>in vitro</i> de anéis de aorta de coelho.....	59
Figura 13 – Efeito da inibição da ativação do fator nuclear NF-κB sobre a indução do receptor B ₁ causado pela incubação <i>in vitro</i> de anéis de aorta de coelho.....	60
Figura 14 – Efeito da associação de vários inibidores sobre a indução do receptor B ₁ causado pela incubação <i>in vitro</i> de anéis de aorta de coelho.....	62
Figura 15 – Experimentos <i>ex vivo</i> com coelhos tratados previamente com LPS seguido por inibidores.....	66
Figura 16 - Experimentos <i>ex vivo</i> com coelhos tratados previamente com LPS e a associação de dexametasona com o inibidor do NF-κB, o PDTC.....	67
Figura 17 – Desenho esquemático que explica o mecanismo proposto para a regulação da indução do receptor B ₁ para as cininas.....	99
Tabela 1 - Efeito de diversas drogas (incubação de 30 min) sobre a contração induzida pela des-Arg ⁹ -BK (1 μM) 6 h após a montagem das preparações de aorta de coelho	64

RESUMO

1. O presente estudo procurou avaliar, através de técnicas moleculares e farmacológicas, o efeito dos glicocorticóides endógenos sobre a expressão do receptor B_1 em ratos. Também foi investigado alguns dos mecanismos envolvidos na indução do receptor B_1 para as cininas na aorta isolada de coelhos.
2. Ratos foram adrenalectomizados (ADX), e 7 dias após receberam por via intraplantar uma injeção do agonista seletivo para os receptores B_1 a des-Arg⁹-BK. Esse tratamento causou aumento significativo do volume da pata, enquanto que apenas um pequeno efeito foi observado em ratos falso-operados. Um aumento semelhante da resposta à des-Arg⁹-BK foi obtido na resposta contrátil mediada pelos receptores B_1 na veia porta isolada de ratos ADX.
3. O tratamento de ratos com mitotano (uma droga que reduz a síntese de corticóides) produziu o mesmo aumento na resposta ao agonista B_1 observado nos animais ADX.
4. Com o objetivo de comprovar o aumento na expressão do receptor B_1 foi realizado o ensaio de proteção à ribonuclease. O resultado mostra a ausência do RNAm codificador para o receptor B_1 e um grande aumento na expressão em pulmão de ratos ADX 7 dias antes.
5. O aumento da resposta ao receptor B_1 em ratos ADX, tanto no edema de pata quanto na contração da veia porta, foi fortemente inibido pelo tratamento

dos animais com a dexametasona, ou com o inibidor da COX-2 o meloxicam, ou com o inibidor do NF- κ B o PDTC. O mesmo grau de inibição foi obtido quando os animais foram tratados com a associação de doses sublimiares de dexametasona mais PDTC.

6. O envolvimento da via do NF- κ B foi confirmado pelo ensaio de deslocamento em gel utilizando extratos nucleares de pulmão, coração e patas de ratos ADX. Além disso, também foi verificado que o tratamento dos ratos ADX com dexametasona, PDTC ou a associação das duas drogas inibiu completamente a ativação do NF- κ B causada pela adrenalectomia.

7. A incubação contínua dos anéis de aorta isolados de coelho com inibidores da ciclooxigenase DFU, NS-398 ou com indometacina, mas não com o piroxicam, por 6 h, resultou em uma inibição significativa do aumento dependente do tempo da contração induzida pela des-Arg⁹-BK, sem afetar a resposta à noradrenalina. Inibidores de quinases (RO 318220, estaurosporina ou tirfostin B42) e inibidores do NF- κ B (PDTC, TLCK ou sulfasalazina) incubados por 6 h, causaram inibição semelhante da contração induzida pela des-Arg⁹-BK.

8. Quando todos os inibidores testados foram incubados por apenas 30 min, 6 h após a montagem das preparações, somente a sulfasalazina inibiu a contração causada pela des-Arg⁹-BK, a qual foi revertida após a lavagem das preparações.

9. As preparações obtidas de coelhos tratados com LPS 12 h antes, o aumento da expressão do receptor B₁ na aorta foi aumentado fortemente. O tratamento adicional *in vivo* com PDTC, dexametasona, genisteína ou com a associação

com doses sublimiares de dexametasona mais PDTC, causou inibição significativa da contração induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta de coelho.

10. Esses resultados analisados em conjunto fornecem evidências moleculares e farmacológicas adicionais indicando que a expressão do receptor B₁ para as cininas pode ser regulada pelos glicocorticóides endógenos através de mecanismo dependente da ativação da via do NF-κB. Além disso, a indução tempo-dependente da contração mediada pela des-Arg⁹-BK na aorta de coelho envolve a ativação da proteína quinase C, da tirosina quinase, com a participação da cyclooxygenase-2 e também da via do NF-κB. Os resultados obtidos com o presente estudo sugerem uma importante participação dos receptores B₁ para as cininas mediando respostas inflamatórias. Além disso, sugerem ainda que pelo menos parte das ações antiinflamatórias dos glicocorticóides pode estar associado com a regulação dos receptores B₁ para as cininas.

ABSTRACT

1. In the present study it was examined by means of molecular and pharmacological functional approaches the effect of endogenous glucocorticoid hormones on the expression of rat B₁ receptors. It was also, investigated some of the mechanisms involved in the up-regulation of the B₁ receptor in the rabbit aorta *in vitro*.
2. Rats were adrenalectomised (ADX), and 7 days after this procedure the intradermal injection of B₁ receptor agonist des-Arg⁹-BK produced a significant increase in the paw volume, while only a weak effect was observed in sham-operated animals. A similar increase in the contractile responses mediated by B₁ agonist des-Arg⁹-BK was also observed in the rat portal vein *in vitro*.
3. Chemical ADX performed with mitotane (a drug that reduces corticosteroid synthesis) produced essentially the same up-regulation of B₁ receptors as that observed in ADX rats.
4. The modulation of B₁ receptor expression was evaluated by ribonuclease protection assay, employing mRNA obtained from the lungs and paw of ADX rats.
5. Additionally, both paw oedema and contraction of portal vein mediated by B₁ agonist des-Arg⁹-BK in ADX rats, were markedly inhibited by treatment with dexamethasone, or with COX-2 inhibitor meloxicam, or with the NF- κ B inhibitor PDTC. Interestingly, the same degree of inhibition was achieved when the

animals were treated with a combination of submaximal doses of dexamethasone and PDTC.

6. The involvement of NF- κ B pathway was further confirmed by mobility shift assay using nuclear extracts from lung, paw and heart of ADX rats. It was also confirmed that the treatment of ADX rats with dexamethasone, PDTC or dexamethasone plus PDTC completely inhibit NF- κ B activation caused by absence of endogenous glucocorticoid.

7. The continuous incubation of rabbit aorta rings with cyclooxygenase inhibitors DFU, NS-398 or indomethacin, but not with piroxicam, for 6 h, resulted in a significant inhibition of spontaneous contraction to the B₁ agonist des-Arg⁹-BK, without affecting NA response. The kinase inhibitors (RO 318220, staurosporine or tyrphostin B42) and the NF- κ B inhibitors (PDTC, TLCK or sulfasalazine) incubated for 6 h each, resulted in similar inhibition of des-Arg⁹-BK-induced contraction.

8. When all inhibitors tested were pre-incubated for only 30 min, 6 h after setting up the preparations, sulfasalazine was the only drug tested that inhibited des-Arg⁹-BK-induced contraction, which was reverted after the washing-out of the preparations.

9. In preparations obtained from animals treated with LPS 12 h prior, the up-regulation of B₁ receptor in the aorta was markedly increased. The *in vivo* treatment with PDTC, dexamethasone, genistein or an association of subliminal doses of dexamethasone and PDTC 12 h prior, which alone had no effect, all caused significant inhibition of des-Arg⁹-BK-induced contraction in the rabbit aorta.

10. Together, these results provide molecular and pharmacological evidence showing that B₁ kinin receptor expression can be regulated through endogenous glucocorticoids by a mechanism dependent on NF-κB pathway. Also, the time-dependent up-regulation of des-Arg⁹-BK-mediated contraction in the rabbit aorta involves the activation of protein kinase C, tyrosine kinase, through participation of cyclooxygenase-2 and even the NF-κB transcription factor pathway. Clinical significance of the present findings stem from evidence showing the importance of B₁ kinin receptors in the mediation of inflammatory related responses.

PUBLICAÇÕES

Os resultados referentes a esta tese estão publicados nos seguintes trabalhos:

1. CABRINI, D.A.; CAMPOS, M.M.; TRATSK, K.S.; AVELLAR, M.C.W.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B(1) receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 132, 567-577, 2001.
2. MEDEIROS, R.; CABRINI, D.A.; CALIXTO, J.B. The *in vitro* and *ex vivo* roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B1 receptor-mediated contraction of the rabbit aorta. **Reg. Peptides**, 97, 121-130, 2001.
3. CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87, 1 – 5, 2000.
4. CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr. Opin. Anesthesiol.**, 2001, NO PRELO.

1. INTRODUÇÃO

Em nosso complexo organismo existem inúmeras substâncias responsáveis pela regulação fisiológica e pelo processo de defesa. Dentre essas importantes substâncias há uma família de peptídeos biologicamente ativos, denominados cininas. Esses peptídeos são mediadores de uma gama de respostas fisiológicas e patológicas, tais como controle da pressão arterial, contração ou relaxamento da musculatura lisa, modulação do fluxo sanguíneo renal, excreção de sódio pela urina, crescimento celular, respostas inflamatórias e indução da dor (Regoli e Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992; Hall e Morton, 1997; Calixto et al., 2000). Além disso, as cininas aumentam o fluxo sanguíneo e promovem o suprimento de nutrientes e oxigênio para tumores, auxiliando na metástase tumoral e estimulando a síntese de DNA, promovendo assim a proliferação celular (Robert e Gulik, 1989; Marceau, 1995; Plendl et al., 2000). A bradicinina foi descrita primeiramente em 1949 por Rocha e Silva e colaboradores enquanto estudavam o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, que causa choque vascular em cães e outras espécies, incluindo o homem. Os autores relataram o efeito de uma nova substância liberada no plasma, pela ação do veneno ou pela tripsina (Rocha e Silva et al., 1949). Essa substância que causa uma contração lenta do íleo isolado de cobaia foi denominada de bradicinina (BK), palavra derivada do grego (*kinin*, indicando movimento; e *brady*, significando lento) (Rocha e Silva et al., 1949; Hall, 1992).

As duas principais cininas são a BK (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e a Lisil-BK ou calidina (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Esses

peptídeos foram identificados como sendo efetores do sistema das cininas, muito relacionadas quimicamente e comparáveis nas suas ações fisiológicas e farmacológicas (Beraldo e Andrade, 1997). As cininas não são estocadas na sua forma ativa como os neurotransmissores clássicos, mas apresentam-se fisiologicamente na forma de grandes moléculas precursoras, os cininogênios, dos quais são liberadas por proteólise. Esta reação é limitada pela ação de diversas serina proteases conhecidas como cininogenases, onde estão incluídas as calicreínas (Regoli e Barabé, 1980; Proud e Kaplan, 1988; Hall, 1992; Raidoo e Bhoola, 1998; Mahabeer e Bhoola, 2000). Os cininogênios são proteínas com múltiplos domínios, que podem ser de três tipos: de alto peso molecular, de baixo peso molecular e o cininogênio-T. Os cininogênios contêm uma seqüência peptídica com nove aminoácidos para a BK ou dez para a calidina. O cininogênio de alto peso molecular, precursor da BK, é uma proteína circulante no plasma, enquanto que o cininogênio de baixo peso molecular, precursor da calidina, é distribuído nos tecidos, fibroblastos e outras células estruturais do tecido conectivo (Bhoola et al., 1992; McLean et al., 2000). O cininogênio-T é equivalente ao cininogênio de alto peso molecular encontrado exclusivamente em roedores (Bhoola et al., 1992).

As calicreínas estão divididas em dois grupos: plasmática e tecidual. Essas proteases são encontradas em fluidos biológicos, tecidos e neutrófilos (Bhoola et al., 1992). A calicreína plasmática é uma serina protease que ocorre no plasma de mamíferos (Mandle et al., 1976; Bouma et al., 1980; Motta et al., 1992), sua precursora é a pré-calicreína plasmática, uma glicoproteína sintetizada e secretada pelos hepatócitos (Henderson et al., 1992), que forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular e circula no plasma ligado à

membrana dos neutrófilos (Handerson et al., 1994). A calicreína plasmática é dependente da ativação da superfície celular, participando na formação dos trombos sangüíneos, da fibrinólise, da regulação do tônus vascular e da inflamação (Bhoola et al., 1992). Quando o fator de Hageman (Fator XII da coagulação) é ativado, tanto por interação com o neutrófilo ou com a membrana endotelial, quanto por ligação com moléculas com carga negativa ou superfície dos tecidos, ocorre a conversão cíclica enzimática da pré-calicreína em calicreína, que através da hidrólise das ligações Lis-Arg e Arg-Ser do cininogênio de alto peso molecular, libera a BK um nonapeptídeo com arginina em ambos os terminais amino e carboxi (Bhoola et al., 1992; Hermann et al., 1999). As calicreínas teciduais, também conhecidas como calicreínas glandulares, são glicoproteínas ácidas que apresentam alta especificidade para quebra de substrato polipeptídico. Sua principal função parece ser a quebra altamente seletiva do cininogênio de baixo peso molecular, liberando a calidina (Werle et al., 1961; MacDonald et al., 1988). A ativação dessa calicreína ocorre após lesão tecidual, infecção e inflamação. Independentemente desse sistema, proteases celulares liberadas de mastócitos e basófilos durante a inflamação aguda também estimulam a formação de cininas (Proud et al., 1985; para revisão ler: Proud e Kaplan, 1988; Hall, 1992; Linz et al., 1995; Proud, 1998; Raidoo e Bhoola, 1998).

Atuando em seus receptores, as cininas exercem um grande número de efeitos fisiológicos e patológicos, incluindo, entre outros, a contração da musculatura lisa, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, contração da vasculatura coronária e pulmonar, dilatação venular, broncoconstrição, dor, aumento da produção de eicosanóides e de óxido nítrico,

participação na resposta inflamatória aguda da microvasculatura, reparo tecidual e cicatrização (Proud e Kaplan, 1988; Dray e Perkins, 1993). É provável que as cininas atuem principalmente por mecanismos autócrino-parácrinos como hormônios locais. Isso porque circulam em baixas concentrações no plasma e são rapidamente degradadas (cerca de 15 segundos) por peptidases específicas. Sendo assim, o controle da ação das cininas é de grande importância e existem diversos grupos de enzimas responsáveis por essa regulação. Aparentemente, todos os tecidos e fluidos biológicos contêm enzimas que são capazes de degradar as cininas. Dentre as várias enzimas, as cininases parecem ser as peptidases mais importantes na regulação desses mediadores. As principais cininases são: a cininase I, representada pelas carboxipeptidases M e N, que são capazes de remover a arginina do terminal carboxílico formando a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina; a cininase II, uma dipeptidil carboxipeptidase, também conhecida como enzima conversora da angiotensina (ECA), que remove o dipeptídeo Phe-Arg do terminal carboxílico, causando inativação das cininas; as endopeptidases neutras, sendo a mais importante a encefalinase, que possui a mesma atividade da ECA (para revisão ler: Proud e Kaplan, 1988; Hall, 1992; Linz et al., 1995; Proud, 1998).

A maioria das ações das cininas são mediadas através de receptores específicos presentes na membrana celular. Dois subtipos de receptores para as cininas foram descritos há mais de 20 anos (Regoli e Barabé, 1980), denominados de B₁ e B₂, caracterizados inicialmente com base nos critérios farmacológicos de ordem de potência dos agonistas em órgão isolado. Na aorta de coelho a ordem de potência é: des-Arg⁹-BK > [Tir(Me)⁸]-BK > BK, correspondendo ao receptor B₁; enquanto que na veia jugular de coelho, na

artéria carótida de cão, no íleo de gato e no útero de rata a ordem de potência é: [Tir(Me)⁸]-BK > BK > des-Arg⁹-BK, correspondendo aos receptores B₂ (Regoli e Barabé, 1980). Mais recentemente, ambos receptores para as cininas foram clonados em várias espécies animais, inclusive em humanos, confirmando assim a existência dos receptores B₁ e B₂ como produto de genes distintos (Hess, 1997; para revisão ler Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000). Os receptores para as cininas pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G, também chamados receptores com sete domínios transmembrana porque suas cadeias de aminoácidos atravessam a membrana celular sete vezes (McEachern et al., 1991; Hess et al., 1992; Menke et al., 1994; Pesquero et al., 1996; Bachvarov et al., 1995; MacNeil et al., 1995). Apesar dos dois tipos de receptores encontrarem-se acoplados aos mesmos mecanismos transduccionais, os receptores B₁ e B₂ possuem apenas 36% de homologia na seqüência de aminoácidos, sendo essa homologia mais evidente nas sete regiões transmembrana. Os receptores para as cininas possuem três regiões extracelulares e quatro alças intracelulares. As alças intracelulares apresentam pouca homologia, apesar dos dois tipos encontrarem-se acoplados ao mesmo tipo de proteína Gq α (Austin et al., 1997). Entretanto, já foi demonstrado que pelo menos parte dos efeitos das cininas não resulta da interação com seus receptores, mas com sua habilidade em interagir diretamente com mastócitos liberando histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina) (Hall e Morton, 1997).

O envolvimento dos receptores para as cininas em diferentes patologias, bem como seus efeitos fisiológicos, são confirmados utilizando uma ferramenta farmacológica bastante importante, os antagonistas seletivos. Grande esforços têm sido feitos na procura de um antagonista das cininas com potencial

terapêutico antiinflamatório e analgésico. Desde o desenvolvimento do primeiro antagonista competitivo baseado no modelo [D-Phe⁷]-BK (Vavrek e Stewart, 1985), que auxiliou significativamente na confirmação do subtipo B₂ como um segundo receptor para as cininas, diversos outros antagonistas foram produzidos, possibilitando estudar a participação desse receptor em diversos processos biológicos. A primeira geração de compostos peptídicos é de baixa potência. A segunda geração de antagonistas peptídicos para os receptores B₂ é bastante seletiva e apresenta uma ação mais prolongada *in vivo*, mas sua utilização é bastante limitada uma vez que estas drogas apresentam baixa atividade por via oral (Calixto et al., 2000). O principal representante desse grupo é um antagonista de alta afinidade, D-Arg-[Hip³, Ti⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK (HOE 140, icatibante) (Hock et al., 1991). Recentemente, foram descritos antagonistas B₂ de terceira geração, que são não-peptídicos, como o WIN 64338, que, por serem ativos por via oral, constituem um passo importante na utilização clínica dessa nova classe de drogas (Salvino et al., 1993). Outros antagonistas B₂, incluindo o FR173657, FR 167344 e NPC 18884, mostraram-se bastante efetivos em bloquear a resposta inflamatória induzida pela BK em diferentes espécies animais (revisado por Hall, 1996; Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000). Vale ainda destacar que já existe um novo agonista não-peptídico seletivo para os receptores B₂ das cininas, o FR 190997 (Gobeil et al., 1999). Esta nova molécula apresentou ativação eficiente nos receptores B₂ de coelhos e cobaias, causando hipotensão. Entretanto, mostrou um perfil farmacológico diferente em outras preparações, agindo como agonista parcial na veia umbilical humana e na veia jugular de coelho, e como antagonista puro na artéria coronária de porco (Rizzi et al., 1999). Essas moléculas não-peptídicas

representam um progresso marcante na química medicinal e serão ferramentas muito úteis para definir o papel desempenhado pelo sistema cinina/caliceína *in vivo*.

O análogo des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, desenhado com base na estrutura dos antagonistas dos receptores da angiotensina II (Regoli et al., 1977), até hoje é o principal antagonista competitivo seletivo para os receptores B₁. Mais recentemente os antagonistas peptídicos D-Arg-[Hip³, Ti⁵, D-Tic⁵, Oic⁸, des-Arg⁹]-BK ([des-Arg¹⁰]-HOE 140) e des-Arg⁹-NPC 17731 foram introduzidos como antagonistas seletivos do receptor B₁ (Wirth et al., 1991; Cabrini et al., 1996). Existem inúmeras tentativas de desenvolver um antagonista seletivo para o receptor B₁ que seja não-peptídico, isso porque esse receptor parece ser o principal responsável pela resposta das cininas em diferentes patologias, como inflamações crônicas e dor.

As ações das cininas estão principalmente relacionadas à ativação da fosfolipase C β decorrente da estimulação dos seus receptores. Dessa associação ocorre a liberação de inositol fosfato e diacilglicerol, seguido de aumento de cálcio, principalmente liberado dos estoques intracelulares, e da ativação da proteína quinase C (Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000). As ações das cininas muitas vezes encontram-se associadas com a produção secundária de outros mediadores incluindo prostanóides, taquicininas, citocinas, produtos derivados de mastócitos e óxido nítrico (NO), com conseqüente ativação de outras vias transduccionais como AMPc e GMPc. Tais efeitos reforçam a idéia da importância das cininas no desenvolvimento e na manutenção dos processos inflamatório e nociceptivo (Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000).

Grande parte dos efeitos fisiológicos das cininas está relacionada com a ativação dos receptores B₂. Esses receptores respondem à ativação com um sinal intracelular forte e imediato, apresentando uma rápida dissociação do ligante, o que faz com que a afinidade pela BK seja diminuída. Após um curto período de exposição ao agonista, o receptor B₂ é seqüestrado, ocorrendo dessensibilização. O resultado desse processo determina um sinal celular de curta duração, seguido por inativação do sistema (Faussner et al., 1999). O receptor B₂ está presente de forma constitutiva nos tratos intestinal, cardiovascular, geniturinário e respiratório e nos tecidos ocular e neuronal. Dessa maneira, a maioria dos efeitos biológicos *in vivo* das cininas como broncoconstrição, hipotensão, reações de inflamação aguda, dor, modulação do fluxo sanguíneo renal, excreção de sódio pela urina e crescimento celular é atribuída à ativação desses receptores (Dray e Perkins, 1993; Proud e Kaplan, 1988; Bhoola et al., 1992; El-Dahr et al., 1997). Os agonistas endógenos seletivos para o receptor B₂ são a BK e a calidina (as cininas ditas "íntactas"), que são equipotentes nesse receptor e praticamente inativos no receptor B₁ (Proud e Kaplan, 1988; Hall, 1992). O gene do receptor B₂ já foi clonado em tecidos de camundongo, rato, cobaia e humano (Ma et al., 1994a e b; McEachern et al., 1991; Powell et al., 1993; Wang et al., 1994, Yokoyama et al., 1994; Farmer et al., 1998). No camundongo, o gene do receptor B₂ está localizado na região distal do cromossoma 12, apresenta três éxons e dois íntrons (Ma et al., 1994a e b; Takedo et al., 1995), possui 91% de homologia com o gene de rato e 82% com o gene humano (Yokoiama et al., 1994). O gene do receptor B₂ do rato parece ser composto de quatro éxons e quatro íntrons (Pesquero e Bader, 1998; Pesquero et al., 1994). O gene humano do receptor B₂

está localizado no cromossomo 14q32, e codifica uma proteína com 364 aminoácidos, com massa molecular de ~41 kDa (Ma et al., 1994b; Powell et al., 1993). A proteína correspondente a esse receptor apresenta regiões para glicosilação, e contém sítio para a ligação da BK na parte amino terminal da terceira alça extracelular (Abd Alla et al., 1996a e b). A proteína contém sítios para a ação de proteínas quinases A e C, sítios para palmitoilação, e muitos outros sítios para fosforilação (Bachvarov et al., 1995). Até o momento, os resíduos de aminoácidos que interagem com a BK são bem conservados entre as espécies nos genes do receptor B₂ (Marceau e Bachvarov, 1998). A expressão do gene desse receptor cininérgico está presente na maioria dos tecidos como pulmão, fígado, rins, pâncreas, glândula salivar, cólon, próstata, útero, estômago, cérebro, coração, medula etc (Hess et al., 1994; Ma et al., 1994b).

Apesar de estar amplamente distribuído no organismo e encontrar-se presente na forma constitutiva, existem alguns relatos sugerindo o aumento da expressão do receptor B₂. Um exemplo conhecido são os neutrófilos isolados do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, onde a densidade de receptores B₂ aparece aumentada significativamente quando comparada à de indivíduos saudáveis (Rajasekariah et al., 1997; Cassim et al., 1996; Bhoola, 1996). Fato semelhante parece ocorrer nas células da musculatura lisa bronquial humana de pacientes asmáticos que apresentam hiperresponsividade à BK. Estudos indicam que, no processo inflamatório associado com o desenvolvimento da asma, ocorre aumento de interleucina-1 β (IL-1 β) que é capaz de estimular a transcrição do gene do receptor B₂, provavelmente através da liberação de prostanóides (Schmidlin et al., 1998). Os mesmos autores

demonstraram que, em células isoladas da musculatura lisa bronquial, as ações da IL-1 β são mediadas pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38, que também induz a superexpressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), liberando prostaglandina (PG) E₂, que, por sua vez, vai atuar aumentando a expressão dos receptores B₂ (Schmidlin et al., 2000).

Com o emprego de técnicas genéticas e moleculares, foram criados camundongos que possuem o gene do receptor B₂ inativado (camundongo nocaute para o receptor B₂) (Borkowski et al., 1995). Os camundongos que são homozigotos para essa deleção são férteis e não podem ser distinguidos visualmente dos seus controles. Pode-se dizer ainda que a expressão de um único gene parece ser responsável por conferir responsividade à BK no tecidos desses animais nocaute (Borkowski et al., 1995). Além disso, camundongos nocaute homozigotos (Bk2r^{-/-}) apresentam pressão sanguínea normal até 50 dias de idade (Emanueli et al., 1999), mas isto é gradualmente aumentado, atingindo um platô em 6 meses (Madeddu et al., 1997; 1999; Emanueli et al., 1999). Já os camundongos heterozigotos apresentam pressão sanguínea sistólica semelhante àquela do controle, até 5 meses de idade, quando então sobe para os níveis elevados até os 7 meses de idade, tornando-se semelhante ao dos nocaute (Madeddu et al., 1999). Esses animais, quando expostos a uma dieta com excesso de cloreto de sódio apresentaram hipertensão severa com lesão terminal dos órgãos (Alfie et al., 1996), sugerindo assim, um papel natriurético e renal importante para o sistema calicreína-cinina. Emanueli e colaboradores (1999), demonstraram ainda que a taxa de crescimento do ventrículo esquerdo dos camundongos nocaute homozigotos para o receptor B₂ e dos heterozigotos foi acelerada, sendo que a

hipertrofia apresentada nos nocaute homozigotos estava associada com a dilatação da câmara e com a elevação da pressão diastólica final no ventrículo esquerdo. Tais resultados levou os autores a concluir que as cininas são essenciais para a preservação funcional e estrutural do coração. Tratando os animais nocaute para o receptor B_2 com inibidores da enzima conversora de angiotensina (captopril), Emanuelli e colaboradores (2000) mostraram o importante papel dos receptores B_2 na hiperplasia da neointima em vasos carotídeos após oclusão.

Na resposta inflamatória, a deleção do gene do receptor B_2 reduz a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, mas não as respostas nociceptivas induzidas pela formalina, CFA ou calor. Na verdade, há um aumento na expressão do receptor B_1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal dos camundongos nocaute para o receptor B_2 (Couture e Lindsey, 2000). Samadfam e colaboradores (2000) investigaram a contribuição dos receptores B_2 no modelo de hipersensibilidade do tipo III, a reação passiva reversa de Arthus. Nos camundongos nocaute para o receptor B_2 , a BK e a anti-albumina bovina de coelho foram capazes de desencadear o aumento no extravasamento plasmático.

Várias evidências sugerem que os receptores B_1 podem amplificar as respostas ou mesmo substituir funcionalmente os receptores B_2 , principalmente em processos inflamatórios crônicos (Coelho et al., 1997; Ahluwalia e Perretti, 1999; Phagoo et al., 1999). O aumento da concentração local de BK no sítio da inflamação (produzida localmente ou por infiltração de leucócitos) pode ativar e reduzir a quantidade do receptores B_2 e levar a um aumento na expressão dos receptores B_1 (Coelho et al., 1997; Ahluwalia e Perretti, 1999).

A importância biológica dos fragmentos des-Arg⁹ da BK e da calidina não estava clara até o momento em que foi mostrado que eles são os agonistas seletivos dos receptores para as cininas presentes na aorta isolada de coelho (Regoli et al., 1977). Essa preparação vascular é contraída pela BK e, inesperadamente, o estudo dos efeitos dos fragmentos das cininas mostrou que a des-Arg⁹-BK foi mais potente do que as principais cininas. Estudos complementares nessa mesma preparação mostraram que a BK e a calidina são parcialmente convertidas nos metabólitos des-Arg⁹ que são os agonistas de preferência nesse tecido (Babiuk et al., 1982; Regoli et al., 1986). A atividade da cininase tem particular importância por ser a enzima responsável pela geração das des-Arg⁹ cininas. Sob condições normais, os receptores B₁ estão ausentes na maioria dos tecidos e esses fragmentos de cininas são funcionalmente silenciosos por não serem capazes de ativar os receptores presentes constitutivamente, os receptores B₂. Somente após determinados estímulos inflamatórios, quando os receptores B₁ são induzidos, é que os metabólitos des-Arg⁹ mostram atividade. Fazem parte do grupo da cininase I a arginina carboxipeptidase, carboxipeptidase N no plasma e carboxipeptidase M nos tecidos (predominantemente ligada à membrana e amplamente distribuída, incluindo na microvasculatura) (Erdos, 1990). A meia vida da des-Arg⁹-BK é de 4 a 12 vezes maior do que a da BK sob as mesmas condições experimentais (Decarie et al., 1996; Blais et al., 1997) e isso parece explicar o fato da concentração *in vivo* da des-Arg⁹-BK ser consistentemente maior do que a da BK. Já foi relatado que após o bloqueio da atividade da cininase II, ocorre aumento da conversão da BK em des-Arg⁹-BK (Decarie et al., 1996; Blais et al., 1997). Esse dado confirma que a cininase I é constantemente ativa no plasma.

Ody e colaboradores (1993) mostraram que, em amostras de sangue obtidas de indivíduos normais, a concentração de des-Arg⁹-BK imunoreativa (204 pg/ml) é muito maior do que a da BK (67 pg/ml). Outro estudo mostrou que indivíduos normais ou com insuficiência renal apresentam concentração de des-Arg⁹-BK maior do que de BK na urina (Marceau et al., 1995). Todos os componentes necessários para a síntese de cininas não estão somente presentes, mas elevados nos sítios inflamatórios. Nos modelos de sepse e de infarto do miocárdio, os níveis das des-Arg⁹-cininas estão aumentados de 2 a 4 vezes (Lamontsagne et al., 1995; Reymond et al., 1995). Essa elevação pode ser decorrente de muitos fatores, como a possibilidade do extravasamento de proteínas plasmáticas nos sítios inflamatórios que fornecem substrato (cininogênio) e enzima (calicreína) para o aumento da síntese de BK e calidina, e conseqüentemente, de des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (Ahluwalia e Perretti, 1999). Além disso, durante a resposta inflamatória, a atividade do sistema calicreína-cinina é aumentado pela ativação da via da calicreína-cinina tecidual (Marceau, 1997). O nível de cininogênio também é elevado pela ação de citocinas (Takano et al., 1995). A síntese de calicreína é aumentada após trauma ou inflamação (Cumming et al., 1994). Outras enzimas que também catalisam a formação de cininas, como a elastase de neutrófilo e a triptase de mastócito, também estão presentes no processo inflamatório (Kozik et al., 1998). Há ainda estudos demonstrando que o exsudato inflamatório é composto de proteínas plasmáticas extravasadas, incluindo a arginina-carboxipeptidase solúvel, que irá metabolizar as cininas predominantemente através da cininase I. A formação de fibrina, típica em muitos exsudatos, aumentará a atividade da cininase I pela geração de arginina-carboxipeptidases instáveis (Hendriks et al.,

1990; Campbell et al., 1990). Estudos realizados com o modelo experimental de sepsis sugerem que os altos níveis dos ligantes endógenos do receptor B₁ estão associados com o aumento da expressão da carboxipeptidase M ligada ao tecido (Raymond et al., 1995; Schremmer-Danninger et al., 1998; para revisão ver Marceau, 1995; Marceau et al., 1998; McLean et al., 2000; Blais et al., 2000). Entretanto, as cininas são muito difíceis de mensurar precisamente, porque amostras sanguíneas contêm todos os componentes necessários para geração e degradação desses peptídeos *in vitro*. Além disso o contato com o vidro dos tubos ativa a proteína plasmática. Os métodos utilizados para medir as concentrações de cininas resumem-se em técnicas utilizando anticorpos (radioimunoensaio e enzima imunoensaio) precedidas por procedimentos de extração bastante complexos (Marceau et al., 1998).

Diferentemente do receptor B₂, o receptor B₁ não apresenta redução da afinidade, causa da dessensibilização, ou internalização, sendo que sua taxa de dissociação do ligante é muito baixa. Ao contrário, um longo tempo de estimulação leva a um aumento do número desses receptores. Assim, todas as respostas associadas ao receptor B₁ decorrentes do estímulo pelo agonista, são favoráveis a uma sinalização persistente (Faussner et al., 1998; 1999). Um grande número de evidências indica que os receptores B₁ normalmente estão ausentes em tecidos de animais em condições normais, mas são rapidamente induzidos (*up-regulation*) após longos períodos de incubação *in vitro*, após certos tipos de trauma tecidual ou infecções, ou ainda após o tratamento com endotoxinas bacterianas, adjuvante de Freund, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico e outros (Marceau, 1995; Lagneux e Ribout, 1997; Marceau e Bachvarov, 1998; Calixto et al., 2000; McLean et al., 2000).

Resultados recentes indicam que esses receptores possuem uma importante contribuição na manutenção dos processos inflamatórios, porque o aumento dos níveis de metabólitos ativos da BK, e a indução do receptor B₁ ocorrem em momentos muito próximos (Bathon e Proud, 1991; Bhoola et al., 1992; Burch et al., 1993; Marceau, 1995).

A indução do receptor B₁ foi demonstrada primeiramente por Regoli e colaboradores (1977), que descreveram que o aumento da reatividade contrátil à des-Arg⁹-BK era dependente do tempo e da síntese protéica, em experimentos realizados na aorta isolada de coelho, 2 a 3 h após a incubação do tecido. Esses autores sugeriram que esse efeito era devido à síntese *de novo* do receptor B₁, uma vez que a resposta está ausente em tecidos tratados com inibidores da transcrição do RNA, translação ou maturação protéica. Esse fenômeno tem sido descrito em muitas outras preparações de musculatura lisa (Marceau, 1995; Marceau et al., 1999), inclusive em tecidos humanos (Drummond e Cocks, 1995; Zuzack et al., 1996). A mesma inibição foi obtida na presença do antiinflamatório esteroide dexametasona (DeBlois et al., 1991). Posteriormente, Audet e colaboradores (1994) demonstraram que a presença de IL-1 β amplifica o processo de indução do receptor B₁ na aorta de coelho *in vitro*. Os mesmos autores demonstraram que o fenômeno de indução do receptor B₁ pela IL-1 β na mesma preparação envolve a síntese *de novo* do receptor, uma vez que inibidores da síntese protéica como o brefeldin A e a tunicamicina aboliram completamente o aumento da resposta ao agonista B₁ (Audet et al., 1994).

Estudos realizados com o uso de radioligantes e agonistas para o receptor B₁ em células de musculatura vascular de coelho confirmaram que a IL-1 β , o fator de crescimento epidermal α e o lipopolissacarídeo (LPS) produzem aumento da

população dos receptores B₁ sem influenciar, contudo, a afinidade do agonista pelo receptor (Marceau, 1995). Campos e colaboradores (1998) demonstraram que a injeção intradérmica de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF α) produz aumento rápido (30-60 min) do edema induzido pela des-Ag⁹-BK. O mesmo efeito foi observado quando os animais foram tratados previamente com LPS (Campos et al., 1996). Em ambos tratamentos, o processo de indução do receptor B₁ pode ser completamente inibido pelo tratamento prévio dos animais com dexametasona ou cicloheximida (Campos et al., 1996; 1998). Sendo assim, pode-se concluir que a indução do receptor B₁ ocorre *in vitro* e *in vivo*, sob o controle de citocinas específicas liberadas em situações de trauma ou estresse, incluindo a IL-1 β e o TNF α .

Além disso, outros estudos *in vitro* mostram que certas citocinas e fatores de crescimento amplificam a resposta mediada pelos receptores B₁, em consequência do isolamento e incubação do tecido (Bouthillier et al., 1987; DeBlois et al., 1991; Levesque et al., 1995; McLean et al., 1999). Agentes que estimulam a síntese das citocinas, como LPS, também levam à expressão funcional do receptor B₁ quando administrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Regoli et al., 1981; McLean et al., 1999; DeBlois et al., 1989). Tem sido descrito na literatura que o aumento na expressão dos receptores B₁ é um mecanismo sensível aos glicocorticóides (DeBlois et al., 1998).

Muitas mudanças na função de receptores farmacológicos estão relacionadas a alterações na quantidade, afinidade e distribuição dos receptores. De um modo geral, muitas células alteram a expressão gênica em resposta a estímulos externos, proporcionando grande complexidade nas respostas rápidas e crônicas. Sabe-se ainda que sinais de transdução não nucleares também

podem induzir uma nova transcrição, alterar rapidamente ou mesmo reverter a transcrição, em consequência de estímulos externos. O controle da expressão de genes pode ser afetado por mudanças nas taxas transcricionais, na estabilidade do RNA e nas vias de inicialização translacional (Brasier e Li, 1996). Em relação esse fenômeno, à indução da transcrição de novos genes, tais como genes de resposta precoce (*immediate-early response genes*) em resposta a mudanças ambientais merece atenção especial (Curran e Morgan, 1995; Donaldson et al., 1997). Com base nesses conhecimentos, novos parâmetros de sinalização para expressão gênica têm sido descritos em decorrência de uma lesão traumática (Donaldson et al., 1997). Apesar da expressão dos receptores estar intimamente relacionada com o nível de RNAm, existem diversos mecanismos envolvidos no aumento da sua expressão, incluindo controles pós-transcricionais e translacionais. Entretanto, a indução *de novo* de um receptor através da ativação transcricional não parece ser um mecanismo comum para a regulação da responsividade do tecido, principalmente em decorrência de processos patológicos. Sendo assim, esse fenômeno parece ser restrito apenas a alguns receptores, como o B₁ para as cininas, o A₁ para a adenosina, o NK₁ para as taquicininas e alguns receptores para as citocinas, entre outros (Donaldson et al., 1997).

Dentre os receptores que apresentam indução *de novo*, o mais estudado e melhor documentado é o receptor B₁ para as cininas (Dray e Perkins, 1993; Marceau, 1995; Hall, 1997; Marceau e Bachvarov, 1998; Marceau et al., 1997; Mahabeer e Bhoola, 2000; McLean et al., 2000; Bockmann e Paegelow, 2000). A indução funcional das respostas mediadas pelo receptor B₁ está associada com o aumento do seu RNAm e a expressão da proteína (Marceau et al., 1998;

McLean et al., 2000). A IL-1 β promove o aumento do RNAm do receptor B₁ e, conseqüentemente, da sua resposta funcional em coração isolado de rato (McLean et al., 1999). O início da elucidação dessa característica de inducibilidade do receptor B₁ ocorreu com a clonagem do seu gene.

A clonagem do gene que codifica o receptor B₁ em diferentes espécies animais, incluindo humanos, ratos, camundongos e coelhos (Hess, 1997; Marceau e Bachvarov, 1998; Pesquero e Bader, 1998), demonstrou uma grande homologia, especialmente entre coelhos e humanos (78%). Em ratos, o gene que codifica o receptor B₁ contém dois éxons, sendo que a região codificadora está totalmente localizada no segundo éxon (Ni et al., 1998). O gene do receptor B₁ humano está localizado no mesmo cromossomo em que se encontra o gene do receptor B₂, o 14q32-32, e possui três éxons separados por dois íntrons (Bachvarov et al., 1996). O primeiro e o segundo éxon são regiões não codificadoras presentes na direção 5' do gene, enquanto que o terceiro éxon é a região codificadora e está localizado na direção 3' do gene. O controle do processo de indução é realizado por promotores distintos que ativam regiões regulatórias específicas no gene que codifica o receptor B₁ e essa regulação parece ser tecido-específica (Marceau et al., 1998). A análise seqüencial da região 5' revelou a presença do consenso TATAbox e numerosas seqüências candidatas a ligação de fatores transcricionais, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), CREB, AP-1, SP1, PEA-3, entre outros (Bachvarov et al., 1996; Marceau et al., 1997; Ni et al., 1998; Yang et al., 1998). Ni e colaboradores (1998) demonstraram que o sítio para a ligação do NF- κ B na região promotora do gene do receptor B₁ é suficiente para a indução do receptor em resposta ao LPS, IL-1 β ou TNF α . Muitos trabalhos mostram que citocinas como IL-1 β e TNF α

possuem ações inflamatórias por induzirem a liberação de outros mediadores inflamatórios, e muitas vezes o fazem através da ativação da via do NF- κ B (Bouscarel et al., 1988; B (Braseir et al., 1996; Meichle et al., 1990; Wiegmann et al., 1994; 1992). A identificação da seqüência que constitui a região promotora do gene do receptor B₁ é considerado de grande importância para estudos relacionados com o controle da expressão desse receptor *in vitro* e *in vivo* (Chai et al., 1996; Yang et al., 1998; Ni et al., 1998). Essas descobertas comprovam sua alta capacidade de ser regulado por mais de um mecanismo ou fator de transcrição. Além disso, outros elementos regulatórios podem existir fora das regiões examinadas (Marceau et al., 1998). Yang e colaboradores (1998) sugeriram que diferentes estimuladores requerem diferentes tamanhos do promotor ou diferentes elementos regulatórios para induzir a transcrição do gene do receptor B₁. Estudos utilizando as técnicas de reação de polimerase em cadeia seguida de transcriptase reversa (RT-PCR) e *Southern blot* mostraram a presença do gene do receptor B₁ em muitos tecidos como: glândula salivar, pâncreas, cólon, útero, ovário, cérebro, pituitária, adrenais, tireóide, fígado, pulmões, próstata, testículos, etc. (Chai et al., 1996). A identificação do gene do receptor B₁ na maioria dos tecidos demonstra a capacidade para a sua indução em diferentes doenças inflamatórias e tumores (Mahabeer e Bhoola, 2000).

Pesquero e colaboradores (2000) produziram camundongos nocaute para o receptor B₁. Apesar desses camundongos serem fenotipicamente normais, saudáveis, férteis e normotensos, eles apresentaram alterações nas respostas à inflamação e à dor. Quando camundongos são tratados com LPS para indução de choque séptico, os animais selvagens respondem com uma queda acentuada da pressão arterial, enquanto que pouca ou nenhuma alteração foi observada

nos animais nocaute para o receptor B₁ (Pesquero et al., 2000). O acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no exsudato pleural, característico da pleurisia induzida por carragenina, não ocorre nos animais nocaute, sugerindo um papel importante exercido pelos receptores B₁ na ativação dessas células. Foi demonstrado ainda o envolvimento do receptor B₁ na percepção da dor. A ativação do receptor B₁ em neurônios da medula espinhal produz aumento na sua excitabilidade reflexa, o que sugere um papel pró-algésico desse receptor *in vivo*. Os resultados também mostram que os camundongos nocaute para o receptor B₁ apresentam hipoalgesia contra estímulo agudo químico (capsaicina ou formalina) e contra estímulo nociceptivo térmico intenso (calor) (Pesquero et al., 2000), sugerindo que os receptores B₁ são essenciais para o surgimento da sensibilidade central que ocorre após a ativação de fibras C. Assim, a hipoalgesia apresentada pelos camundongos nocaute para o receptor B₁ deve-se principalmente a redução da sensibilidade de neurônios medulares a estímulos nociceptivos. Baseando-se no fato dos animais nocaute para o receptor B₁ mostrarem hipoalgesia no teste da formalina, os autores sugerem que é possível que esses receptores localizados nos terminais nociceptivos ou interneurônios da medula poderiam mediar seus efeitos centrais (Pesquero et al., 2000). Ao contrário, animais nocaute para o receptor B₂ não apresentaram alteração na sensibilidade nociceptiva à formalina (Rupniak et al., 1997). Portanto, o uso dos animais nocaute para o receptor B₁ poderá esclarecer seus papéis fisiopatológicos, propiciando novas idéias para a aplicação de antagonistas deste receptor como drogas antiinflamatórias e analgésicas (Regoli, 2000).

Pan e colaboradores (1998) descreveram que a BK, atuando em receptores B₂, pode induzir a ativação do NF- κ B e a expressão do gene da IL-1 β em cultura

de células epiteliais humanas. Reforçando essa idéia, outras evidências sugerem que a estimulação desses receptores também produz a ativação de vias de sinalização alternativas, representadas pela fosforilação de algumas classes de quinases como tirosina quinase, quinases ativada por mitógeno, proteína ribossomal S6 quinase e fosfatidilinositol-3-quinase (Pyne et al., 1997; Pan et al., 1999; Ritchie et al., 1999; para revisão ler Calixto et al., 2000). Como relatado por Hayashi e colaboradores (2000), a BK, atuando em receptores B₂, estimula a produção de interleucina-6 e interleucina-8 em fibroblastos de pulmão humano, através da ativação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e da p38 MAPK. Dessa forma, pode-se especular que as respostas mediadas pelo receptor B₂ devem envolver síntese protéica e, possivelmente, a indução do receptor B₁. Sob esse contexto, alguns autores propuseram que a ativação do receptor B₂ ocorre no início do processo inflamatório e, através de mecanismos auto-regulatórios, esses receptores sofrem dessensibilização, seguida da expressão dos receptores B₁. A ativação de receptores B₂ e estimulação de certas vias de segundos mensageiros pode ser responsável pelo aumento da população dos receptores B₁, sugerindo a existência de um balanço entre as duas populações de receptores durante os processos inflamatórios (Calixto et al., 2000).

O processo de indução do receptor B₁ parece ser complexo. Existem inúmeros trabalhos desenvolvidos na tentativa de compreender melhor os mecanismos envolvidos na sua regulação e na função exercida pelos receptores B₁, principalmente no desenvolvimento dos processos inflamatórios e dolorosos. Entretanto, ainda circulam muitas dúvidas a esse respeito do papel exercido pelos dois receptores das cininas, B₁ e B₂, durante o desenvolvimento do

processo inflamatório. A melhor compreensão desse processo é fundamental para o esclarecimento da função desses mediadores em patologias como asma, doenças inflamatórias renais, artrite reumatóide, dor, câncer, choque séptico, entre outros. Dessa forma, considerando que as cininas estão envolvidas em várias doenças inflamatórias, que o receptor B₁ parece ser o principal responsável pela ação desses peptídeos no desenvolvimento de certas patologias e que tem como principal função a manutenção do processo inflamatório crônico, o conhecimento deste receptor parece ser um alvo terapêutico importante para a Farmacologia. Sendo assim, é de grande interesse desenvolver novas drogas que atuem sobre esse receptor, tanto no processo de indução, quanto na sua ativação, e para tal é necessário um melhor conhecimento a respeito da sua regulação, função e dos mecanismos intracelulares relacionados com suas respostas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, o envolvimento dos corticóides endógenos, da COX-2, de algumas proteínas quinases e do NF- κ B no processo de indução do receptor B₁ para as cininas em ratos e coelhos.

2.2. Objetivos específicos

a. Avaliar alguns dos mecanismos envolvidos no processo de indução do receptor B₁ em ratos com déficit da produção endógena de corticóides, através da análise da resposta ao agonista seletivo para os receptores B₁ (des-Arg⁹-BK), nos modelos de edema de pata *in vivo* e da contração da veia porta *in vitro*.

b. Estudar o efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ para as cininas e de inibidores da COX no edema de pata induzido pela a des-Arg⁹-BK em ratos adrenalectomizados (ADX).

c. Analisar a influência do tratamento de ratos ADX com inibidores do NF- κ B ou com o corticóide dexametasona durante o processo de indução do receptor B₁.

d. Quantificar o RNA para o receptor B₁ no tecido de animais ADX pela técnica de proteção à ribonuclease.

e. Verificar a ativação do NF- κ B nos tecidos de animais ADX, bem como da inibição desse fator de transcrição pelo tratamento dos animais com inibidores, utilizando a técnica de deslocamento da ligação em gel.

f. Estudar o efeito de inibidores de proteínas quinases, COX e NF- κ B na indução do receptor B₁ na aorta de coelho *in vitro*.

g. Verificar o resultado da associação de alguns inibidores das vias de transdução sobre a indução dependente do tempo de incubação do receptor B₁, na aorta isolada de coelhos.

h. Avaliar a influência do tratamento com o inibidor do NF- κ B, dexametasona ou inibidor da tirosina quinase sobre o aumento da resposta ao agonista B₁ na aorta isolada de coelhos tratados com LPS.

i. Estudar o efeito da associação da dexametasona e do inibidor do NF- κ B no processo de indução do receptor B₁, tanto em ratos ADX, quanto no modelo da aorta isolada de coelhos tratados com LPS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos machos Wistar e coelhos brancos New Zeland de ambos os sexos foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os ratos foram alojados em grupos de 6-8 animais por caixa, e os coelhos um por caixa, com livre acesso à água e ração, em temperatura constante de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ e ciclo de luz claro\escuro de 12 h (luz das 6:00 às 18:00 h).

O presente estudo procurou seguir as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH), dos Estados Unidos da América.

3.2. Supressão de corticóides endógenos

3.2.1. Adrenalectomia

Os experimentos foram realizados utilizando ratos Wistar machos (140-180 g). Na maioria dos experimentos os animais foram ADX de acordo com os procedimentos descritos por Flower et al. (1986), com pequenas modificações. Para tal, ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (0,25 g/kg, i.p.). Em seguida, foi feita uma incisão na região dorsal (aproximadamente 2 cm) e as duas glândulas adrenais foram removidas. Após a cirurgia, os animais foram devolvidos às suas caixas, onde tiveram livre acesso à comida. Para manter as concentrações plasmáticas de sódio, a água foi substituída por solução de NaCl 0,9%. Os experimentos foram

realizados do 1^o ao 14^o dia após a cirurgia. Em outro grupo, os animais foram submetidos ao procedimento descrito acima, mas as glândulas adrenais foram preservadas e esses animais foram utilizados como controle (falso-operados, FO). Os níveis de corticosterona nos ratos ADX e FO foram quantificados pela técnica de radioimunoensaio (Coat-A-Count rats corticosterone kit, DPC, Los Angeles, CA, USA), de acordo com a descrição do fabricante.

3.2.2. Tratamento com mitotano

Com o objetivo de testar outra metodologia para a retirada dos corticóides endógenos, foi utilizada uma droga que suprime a produção dos hormônios pelas glândulas adrenais, ou seja, realizado uma adrenalectomia química. Um grupo de animais foi tratado com mitotano (2,2-bis [2-clorfenil-4-clorfenil]-1,1-dicloroetano; o'p'-DDD) (1-1,6 g/kg, v.o., uma vez ao dia por 10 dias), um agente adrenocorticolítico (Schulick e Brennan, 1977; Moore et al., 1980; Cai et al., 1995), com o objetivo de analisar os efeitos do bloqueio químico da síntese de glicocorticóides. Outro grupo de animais recebeu salina (v.o., 10 dias) e foi utilizado como controle. A dose de mitotano foi escolhida com base em experimentos preliminares.

3.3. Castração

Visando avaliar a influência de outro processo cirúrgico, que não a adrenalectomia, sobre a indução do receptor B₁, outro grupo de animais foi submetido à uma cirurgia para castração. Os ratos foram primeiramente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (0,25 g/kg, i.p.) e, através de uma

pequena incisão em cada uma das bolsas escrotais, os testículos foram removidos. No sétimo dia após a cirurgia foi feita a avaliação da resposta edematogênica causada pelo agonista B₁, a des-Arg⁹-BK. Alguns ratos sofreram somente as incisões e foram utilizados como controle, FO.

3.4. Edema de pata de rato

Ratos FO, ADX (1 a 14 dias), castrados ou tratados com mitotano, e seus respectivos controles, foram levemente anestesiados com éter e receberam por injeção intraplantar 0,1 ml de salina tamponada com fosfato (PBS; composição, mmol/l: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10) contendo o agonista seletivo para os receptores B₁, a des-Arg⁹-BK (10 – 100 nmol/pata), ou o agonista seletivo dos receptores B₂, a tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) na pata posterior direita. A pata esquerda recebeu o mesmo volume de PBS (0,1 ml) e foi utilizada como controle. Na maior parte dos experimentos, os animais foram tratados com captopril (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes para prevenir a degradação dos peptídeos. O edema foi avaliado utilizando-se um pletismômetro (Ugo Basile, Itália) em diferentes tempos (10, 20, 30, 60 e 120 min) após a injeção de cininas e a diferença entre as patas direita e esquerda foi expressa em ml.

3.5. Veia porta de rato

Ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e a veia porta foi isolada como descrito por Campos e Calixto (1994). Uma cânula fina (PE 50) foi inserida no vaso e, após a remoção dos tecidos aderentes e da gordura, a

veia porta foi isolada. Anéis de 2 a 3 mm de comprimento (um por animal) foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit (composição, mM: NaCl 118, KCl 4,4, MgSO₄ 1,1, CaCl₂ 2,5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2 and glicose 11), mantida à 37 °C, pH 7,4, continuamente gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. As mudanças na tensão isométrica foram registradas em polígrafo através de um transdutor de força (Letica Instruments, Espanha), sob uma tensão basal de 0,5 g. As preparações foram mantidas em equilíbrio por 60 min antes da adição de drogas e durante este período, a solução do banho foi trocada a cada 20 min. Para confirmar a viabilidade dos tecidos, decorrido o período de equilíbrio, as preparações foram expostas a uma solução contendo alta concentração de potássio (KCl 80 mM, preparado por substituição equimolar de 74,4 mM de NaCl por KCl no meio), como um estímulo padrão. Os experimentos foram iniciados 30 min após a lavagem e a reposição com solução de Krebs normal. Na maioria dos casos foram montadas 6 preparações simultaneamente. Passados 90 min após a montagem das preparações, foram realizadas curvas concentração-resposta completas não cumulativas para o agonista seletivo B₁, a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM), ou para a noradrenalina (NA, 1-3000 nM), através da adição de concentrações crescentes isoladas, com 30 min de intervalo entre uma concentração e outra. As respostas contráteis foram expressas em gramas de tensão.

3.6. Influência do tratamento de ratos ADX com inibidores

Com o objetivo de confirmar a participação dos receptores B₁ na resposta ao agonista des-Arg⁹-BK na indução do edema de pata de ratos ADX, um grupo de animais ADX recebeu, no sétimo dia após a cirurgia, uma injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em associação com des-Arg⁹-NPC 17731 (10 nmol/pata, antagonista seletivo dos receptores B₁) ou com HOE 140 (10 nmol/pata, antagonista seletivo dos receptores B₂).

Para avaliar a participação da COX no edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK em ratos ADX, no sétimo dia após a cirurgia, animais foram pré-tratados com indometacina (2 mg/kg, i.p., 30 min antes, inibidor não seletivo da COX) ou com meloxicam (3 mg/kg, i.p., 30 min antes, inibidor com certa seletividade para a COX-2) e a resposta edematogênica foi medida como descrito acima.

Um grupo de ratos ADX foi tratado com dexametasona (0,5 mg/kg/dia, s.c.) durante 6 dias, a fim de avaliar se o tratamento com corticóide exógeno (dexametasona) era capaz de reverter o aumento da expressão do receptor B₁. Sete dias após a cirurgia, foi feita a avaliação da resposta ao agonista B₁ no edema de pata e na contração da veia porta *in vitro*, nesses animais.

Procurando verificar o possível envolvimento da via do NF-κB na indução do receptor B₁ causado pela ausência dos corticóides endógenos, alguns ratos ADX foram tratados com o inibidor da ativação do NF-κB, o pirrolidilditiocarbamato (PDTC, 100 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia, por 6 dias consecutivos, a partir do primeiro dia após a cirurgia. Para analisar o possível mecanismo de ação sinérgico entre corticóides e os inibidores do NF-κB,

outro grupo de animais ADX recebeu dexametasona (0,05 mg/kg, s.c.) em combinação com o PDTC (10 mg/kg, i.p.) (em doses que esses inibidores não produziram qualquer efeito quando utilizados isoladamente) a cada 24 h durante 6 dias consecutivos. Os efeitos desses tratamentos sobre a resposta ao receptor B₁ foram avaliados no sétimo dia após a cirurgia, nos mesmos modelos descritos anteriormente.

3.7. Influência da adrenalectomia na resposta edematogênica induzida pela carragenina ou pela dextrana

Para verificar a influência da adrenalectomia sobre a resposta inflamatória induzida por outros agentes, alguns animais FO ou ADX, no sétimo dia após a cirurgia, receberam por via intraplantar carragenina (300 µg/pata) ou dextrana (100 µg/pata) e o edema da pata foi avaliado até 4 h após o tratamento.

3.8. Análise da mobilidade eletroforética por deslocamento em gel pela ligação de extratos nucleares com o oligonucleotídeo consenso para o NF-κB

Para confirmar a participação do fator de transcrição NF-κB no aumento da resposta à des-Arg⁹-BK pela adrenalectomia nos animais foi utilizada a técnica de deslocamento da ligação em gel por eletroforese. Para tal, foram obtidos pulmões de ratos tratados com lipopolisacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 5 mg/kg, i.p., 60 min antes), que foram usados como grupo controle positivo (Liu et al., 1997). Foram obtidos tecidos dos pulmões,

patas e corações de ratos FO ou ADX, ou ainda pulmões de ratos ADX e tratados ou não com PDTC, dexametasona ou com a combinação das duas drogas em doses sublimiares. Logo após a morte dos animais, os tecidos foram rapidamente congelados e pulverizados sob nitrogênio líquido e, quando necessário, mantidos a -70° C. Posteriormente, foram preparados extratos nucleares desses tecidos como descrito por Shames e colaboradores (1998). Os tecidos foram primeiramente suspensos em 30 volumes de tampão solução A gelada (10 mmol/l HEPES pH 7.9, 10 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l EDTA, 0,35 mol/l sacarose, 0,5% NP-40, 0,5 mmol/l DTT, 0,5 mmol/l fenilmetilsulfonilfluoreto-PMSF) e foram então homogenizados em Politron por 20 s duas vezes. O homogenato foi centrifugado a 1500 x g por 25 min. O precipitado foi re-suspendido e homogenizado em 15 ml da solução B (10 mmol/l HEPES pH 7.9, 10 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l EDTA, 0,7 mol/l sacarose) e o homogenato foi mais uma vez centrifugado a 1500 x g por 30 min. A seguir, o precipitado foi lavado em tampão contendo 10 mmol/l HEPES pH 7.9, 10 mmol/l KCl e 0,1 mmol/l EDTA. Após nova centrifugação a 1500 x g por 30 min, o precipitado foi re-suspendido em tampão para extração com alta concentração de sal (100-200 μ l) (20 mmol/l HEPES pH 7.9, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 0,42 mol/l NaCl, 0,2 mmol/l EDTA, 25% glicerol, 0,5 mmol/l DTT, 0,5 mmol/l PMSF) e incubado a 4 $^{\circ}$ C por 20 min. O extrato nuclear foi centrifugado por no mínimo 30 min a 1500 x g. O sobrenadante foi re-suspenso em solução contendo 20 mmol/l HEPES pH 7.9, 50 mmol/l KCl, 0,2 mmol/l EDTA, 20% glicerol, 0,5 mmol/l DTT, 0,5 mmol/l PMSF e estocado à -70° C até o uso. A concentração de proteína foi determinada utilizando o *kit* para dosagem de proteína da BioRad (*BioRad Protein Assay kit*).

O ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética foi realizado utilizando o *Kit Gel Shift Assay System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o oligonucleotídeo de dupla-fita com consenso para o NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [γ ³²P]ATP (DuPont, New England) na presença da T₄ polinucleotídeo quinase por 10 min a 37 °C. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos quando a mistura foi passada em uma coluna de Sefadex G-25 (Amersham Pharmacia). Os extratos nucleares (pulmão 20 μ g, coração 30 μ g ou pata 10 μ g) foram incubados com tampão de ligação do ensaio (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 4% glicerol; and 1 μ g of poli(dIdC)) por 20 min em temperatura ambiente, em um volume final de 20 μ l. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 min em temperatura ambiente com \cong 25.000 cpm do oligonucleotídeo [³²P]-NF- κ B. Os complexos proteína-DNA foram avaliados em gel não-desnaturante 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) em 0,25 x de tampão Tris-borato/EDTA (TBE) a 150 V por 2 h. O gel foi seco por vácuo e analisado utilizando o sistema de *Phosfo-imager* FUJIX BAS 2000 (Düsseldorf, Germany). Para os estudos de competição, os oligonucleotídeos consenso para o NF- κ B ou para o TFIID (5'-GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA-3') não marcados foram adicionados na mistura em excesso em relação à quantidade de sonda marcada, com a função de detectar interações DNA/proteína específicas e não específicas, respectivamente.

3.9. Ensaio de proteção à ribonuclease (RPA)

Com o objetivo de analisar a expressão do RNA codificador do receptor B₁ no pulmão dos animais ADX ou FO, foi utilizada a técnica de RPA (Pesquero et al., 2000). A sonda do receptor B₁ foi obtida através de clonagem de um fragmento de PCR gerado utilizando os *primers* 5-'CAGCCCTCTAACCGAAGCCTGC-3' (senso); 5'-ACACCAGATCGGAAGCCGCC-3' (anti-senso) baseado na seqüência gênica para o receptor B₁ das cininas de rato (Genbank AF009899) e o DNA genômico como *template*. O fragmento de PCR foi clonado no plasmídeo pGem-T^{easy} (Promega) e linearizado por digestão com SpeI. O comprimento total da sonda anti-senso foi de 321 nucleotídeos e 259 nucleotídeos antes e após a digestão com RNase A/T1, respectivamente. Uma sonda de β-actina com 170 pb (não digerido) e 150 pb (após a digestão com RNase A/T1) foi utilizada como controle interno. O ensaio de proteção à RNase foi realizado com o *kit Ambion RPA III* (ITC Biotechnology GmbH, Austin, TX) de acordo com as instruções do fabricante. As sondas de RNA anti-senso específicas foram preparadas utilizando ³²P-α-UTP e transcritas com T7 RNA polimerase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Aproximadamente 80.000 cpm de cada sonda foi hibridizada com as amostras de RNA (50 µg do RNA total extraído dos pulmões). Os fragmentos hibridizados foram separados por eletroforese em gel desnaturante e analisados usando FUJIX BAS 2000 (Düsseldorf, Germany) sistema de *Phosphor-Imager*. A análise quantitativa foi realizada por mensuração da intensidade da banda do receptor B₁ normalizada pela intensidade da banda da β-actina.

3.10. Aorta isolada de coelho

Em outra série de experimentos, o mecanismo de indução do receptor B_1 foi estudado no modelo de aorta isolada de coelhos tratados ou não com diferentes drogas. A aorta torácica foi isolada de coelhos brancos New Zeland de ambos os sexos (2-3 kg), como descrito por DeBlois e colaboradores (1988) e Audet e colaboradores (1994). Os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital (60 mg/kg, i.v.; administrado na veia marginal da orelha), seguido pelo corte das artérias carótidas. A artéria aorta foi rapidamente removida, cuidadosamente dissecada dos tecidos conectivos e cortada em anéis (~4 mm de diâmetro, 2-3 mm em comprimento; 14-20 mg de peso). As preparações foram suspensas entre dois ganchos de metal sob uma tensão basal de 2 g em cubas de vidro contendo 5 ml da solução de Krebs-Henseleit mantida a 37°C, pH 7.4, continuamente aeradas com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . As contrações isométricas foram registradas por meio de um transdutor de força (modelo F-60, Narco Bio-Systems, Houston, TX) acoplado a um registrador Narco Bio-Systems (modelo Narcotrace, Narco Bio-Systems, Houston, TX). As respostas contráteis foram expressas como a percentagem da contração induzida pelo KCl (40 mM). Normalmente, foram obtidos 8 anéis do mesmo animal que foram montados em paralelo. Alguns coelhos receberam tratamento prévio com diferentes drogas, e todas as injeções foram realizadas sob anestesia leve com pentobarbital (37 mg/kg, i.v.). Pelo menos 3 animais foram utilizados em cada grupo experimental.

Decorrido o período de estabilização de 60 min, as preparações foram expostas a uma única concentração de KCl (40 mM) como um estímulo

padrão. Após a lavagem e o relaxamento completo da preparação o agonista seletivo dos receptores B₁, des-Arg⁹-BK (1 μM, concentração próxima à que causa a resposta máxima), foi adicionada ao banho 2, 4 e 6 h (ou 1, 2 e 4 h, no caso dos animais tratados com LPS) após a montagem dos tecidos. Diversas estimulações com des-Arg⁹-BK foram realizadas com o intuito de monitorar o aumento da sua resposta dependente do tempo nos anéis de aorta. Ao final dos experimentos (6h30 após a montagem) as preparações foram contraídas com NA (1 μM), utilizada como controle *in vitro*. Os tecidos permaneceram em contato com o agonista por cerca de 10 min. Um intervalo de 30 min foi utilizado para recuperação e aplicação de novas drogas. Entre cada adição de des-Arg⁹-BK, as preparações foram lavadas 3 a 5 vezes e somente após o relaxamento completo e 30 min de repouso um novo agente foi adicionado ao banho.

3.11. Influência de inibidores da COX, do NF-κB e de proteínas quinases sobre o aumento da resposta dependente do tempo ao agonista B₁

Para verificar a influência das enzimas COX no processo de indução do receptor B₁ na aorta de coelho, algumas preparações foram expostas continuamente ao inibidor não seletivo da COX a indometacina (30 μM), aos inibidores seletivos da COX-2 o NS-398 (1 μM) ou o DFU (1 μM), ou ainda, ao inibidor mais seletivo para a COX-1 o piroxicam (100 μM). Sempre na presença dessas drogas, as preparações foram contraídas com o agonista B₁ des-Arg⁹-BK (1 μM) 2, 4 e 6 h após a montagem das preparações. A resposta

contrátil à NA (1 μM) foi também avaliada na presença desses inibidores da COX após 6h30. Utilizando ainda este mesmo protocolo, agora com o objetivo de avaliar a influência da ativação da via do fator de transcrição NF- κB , drogas que são conhecidos inibidores desse fator foram adicionadas às preparações. Sulfasalazina (300 μM), PDTC (300 μM) ou N α -p-tosil-lisina cloro-metil cetona (TLCK, 30 μM) permaneceram incubadas ao banho durante todo o experimento. Da mesma forma que o protocolo anterior, 2, 4 e 6 h após a montagem as preparações foram contraídas com o agonista seletivo B₁ des-Arg⁹-BK (1 μM), e no tempo de 6:30 h de montagem foi feita a avaliação da resposta à NA (1 μM).

Outra parte desse estudo teve a intenção de verificar o envolvimento de algumas proteínas quinases na indução tempo-dependente do receptor B₁ na aorta isolada de coelhos. Para tal os tecidos foram continuamente incubados com inibidores da proteína quinase C, RO 318220 (1 μM) ou estaurosporina (100 nM), com um inibidor da tirosina quinase genisteína (30 μM) ou com um inibidor da janus quinase (JNK), tirfostim (100 μM).

Em outro grupo de experimentos, com o objetivo de testar uma possível ação dos inibidores estudados sobre a resposta desencadeada pela ativação do receptor B₁ e não sobre o mecanismo de indução, 6 h após a montagem das preparações *in vitro* (isto é, após a indução completa do receptor B₁), estas foram expostas à des-Arg⁹-BK (1 μM) e após a lavagem e o relaxamento completo, os tecidos foram pré-incubados com um dos inibidores testados por cerca de 30 min e foi obtida nova resposta à des-Arg⁹-

BK na presença do inibidor. Alguns tecidos receberam apenas o veículo utilizado para a diluição das drogas e serviram como controle.

Para verificar a possibilidade de uma ação sinérgica entre as drogas inibidoras testadas, foram realizados experimentos aplicando um protocolo de associação de dois ou mais inibidores que causaram diminuição da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK. Mantendo o protocolo anterior, estas drogas permaneceram continuamente em contato com as preparações.

3.12. Efeito de algumas drogas sobre a indução, *in vivo*, do receptor B₁ em decorrência do tratamento dos animais com LPS

Para avaliar o efeito dos inibidores na indução do receptor B₁ *in vivo*, alguns coelhos receberam LPS (50 µg/kg, i.v.) 12 h antes do sacrifício do animal e isolamento da aorta. Imediatamente após a injeção de LPS, os animais foram tratados com salina (0,2 ml) ou com uma das seguintes drogas: dexametasona (0,4 mg/kg, s.c.), PDTC (50 mg/kg, i.p.), genisteína (5 mg/kg, i.p.), ou com doses sublimiares de dexametasona (0,04 mg/kg, s.c.) ou PDTC (5 mg/kg, i.p.), ou ainda pela associação das duas últimas. Todas as drogas foram administradas 12 h antes do sacrifício do animal, exceto a dexametasona que foi administrada duas vezes (24 e 12 h antes dos experimentos). Os animais foram sacrificados e a aorta isolada como descrito anteriormente. As respostas à des-Arg⁹-BK (1 µM) foram avaliadas 1, 2 e 4 h após a montagem das preparações. Ao final dos experimentos os tecidos também foram expostos à NA (1 µM).

3.13. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média \pm erro padrão da média. A comparação estatística dos dados foi feita pelo teste “t” de Student não pareado ou pareado ou pelo teste de variância ANOVA seguido pelo Bonferroni, quando necessário. Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados significantes.

3.14. Drogas e reagentes

As drogas usadas foram: des-Arg⁹-BK, captopril, dexametasona, 2,2,2-tribromoetanol, noradrenalina, pentobarbital sódico, pirrolidinaditiocarbamato (PDTC), lipopolisacarideo de bactéria (LPS, *E. coli* sorotipo 0111B4, L = 2630), N α -p-tosil-L-lisina cloro-metil cetona (TLCK), indometacina, estaurosporina, tirosina⁸-BK (Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., U.S.A.). Des-Arg⁹-NPC 17731 e HOE 140 foram gentilmente doados pela SCIOS-NOVA Corporation (Baltimore, CA, USA) e pela Hoechst (Frankfurt, Alemanha). Tirfostim B42, genisteína, RO 318220 foram obtidos da Research Biochemicals International (RBI, Natick, MA, USA). NS-398 (N-[2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil] metanesulfonamida) e piroxicam foram obtidos da Tocris Cookson (Ballwin, MO, USA). DFU (5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) fenil-2(5H)-furanona) foi gentilmente cedido pela Merck Frost (Canadá). Mitotano (Lisodren®, Bristol-Myers Squibb, Califórnia, EUA) foi doado pelo Hospital Universitário, UFSC, (Florianópolis, Brasil). A sulfasalazina foi obtida do Laboratório APSEN (São Paulo, S.P., Brasil).

A maioria das drogas foi estocada em soluções 1-10 mM e mantidas à -20°C. As drogas foram diluídas até a concentração desejada em PBS (tratamento *in vitro*) ou salina (tratamento *in vivo*) momentos antes do uso. Os peptídeos foram mantidos em tubos plásticos siliconizados. A NA foi dissolvida em 0,9% de solução NaCl contendo ácido ascórbico (50 µg/ml), para evitar sua oxidação. O PDTC foi dissolvido em solução contendo 5% etanol e a genisteína, o RO 318220, a estaurosporina, o NS-398, o piroxicam e o DFU foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto que o tirfostin B42 e a indometacina foram dissolvidos em etanol. A concentração final de etanol ou de DMSO não excedeu 0,05%. As diluições finais foram feitas em solução de Krebs-Henseleit. Em todos os grupos experimentais foram realizados experimentos controle na presença do veículo utilizado para diluição da droga. Os veículos utilizados não tiveram qualquer efeito farmacológico sobre o tônus da preparação ou sobre a resposta induzida pelo agonista.

4. RESULTADOS

4.1. Indução do receptor B₁ após adrenalectomia dos animais

Como descrito por Campos e Calixto (1995), a injeção do agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK (em doses acima de 300 nmol) causou um aumento discreto na formação do edema da pata em ratos que não receberam qualquer tratamento (R_{\max} 0,07 ± 0,02 ml). Por outro lado, a injeção intraplantar do agonista seletivo para os receptores B₂, a tirosina⁸-BK (0,3-10 nmol/pata) produziu edema bastante pronunciado e dependente da dose (DE₅₀ 1,1 nmol/pata, R_{\max} 0,38 ± 0,03 ml) (resultados não mostrados). Entretanto, 7 dias após a adrenalectomia dos animais, a injeção de des-Arg⁹-BK (10-100 nmol/pata) produziu a formação de edema dose-dependente bastante significativo (R_{\max} 0,23 ± 0,02 ml) quando comparado com os resultados obtidos com ratos FO (R_{\max} 0,18 ± 0,01 ml) (Figura 1A e C). Já o edema de pata induzido pelo agonista B₂, a tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) não foi modificado pela remoção das glândulas adrenais quando comparado com animais FO (Figura 1D). Sete dias após a cirurgia não foram detectados níveis plasmáticos de corticosterona em animais ADX, quando avaliado pela técnica de radioimunoensaio. Porém, a concentração desse hormônio em ratos FO foi significativamente aumentada quando comparado com ratos normais (R_{\max} 148,2 ± 4,6 e 102,0 ± 5,6 ng/ml, respectivamente).

Como demonstrado por Campos e Calixto (1994), a resposta contrátil da veia porta de rato *in vitro* induzida pela des-Arg⁹-BK aumentou significativamente em função do tempo, um efeito que pode ser bloqueado pelo inibidor da síntese protéica (cicloheximida), sugerindo a formação *de novo* dos receptores B₁. Na veia porta isolada de ratos ADX 7 dias, seguindo 1h30 de equilíbrio, a curva concentração-resposta para a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM) foi deslocada para a esquerda (6 vezes, CE₅₀ 35 nM) e a resposta máxima foi aumentada (R_{max} 0,52 ± 0,03 g) quando comparado com os resultados obtidos nos animais FO (CE₅₀ 180 nM e R_{max} 0,38 ± 0,02 g) (Figura 1B). Já a contração mediada pela NA (1 μM) não sofreu qualquer alteração nos tecidos de animais ADX 7 dias e FO (resultados não mostrados).

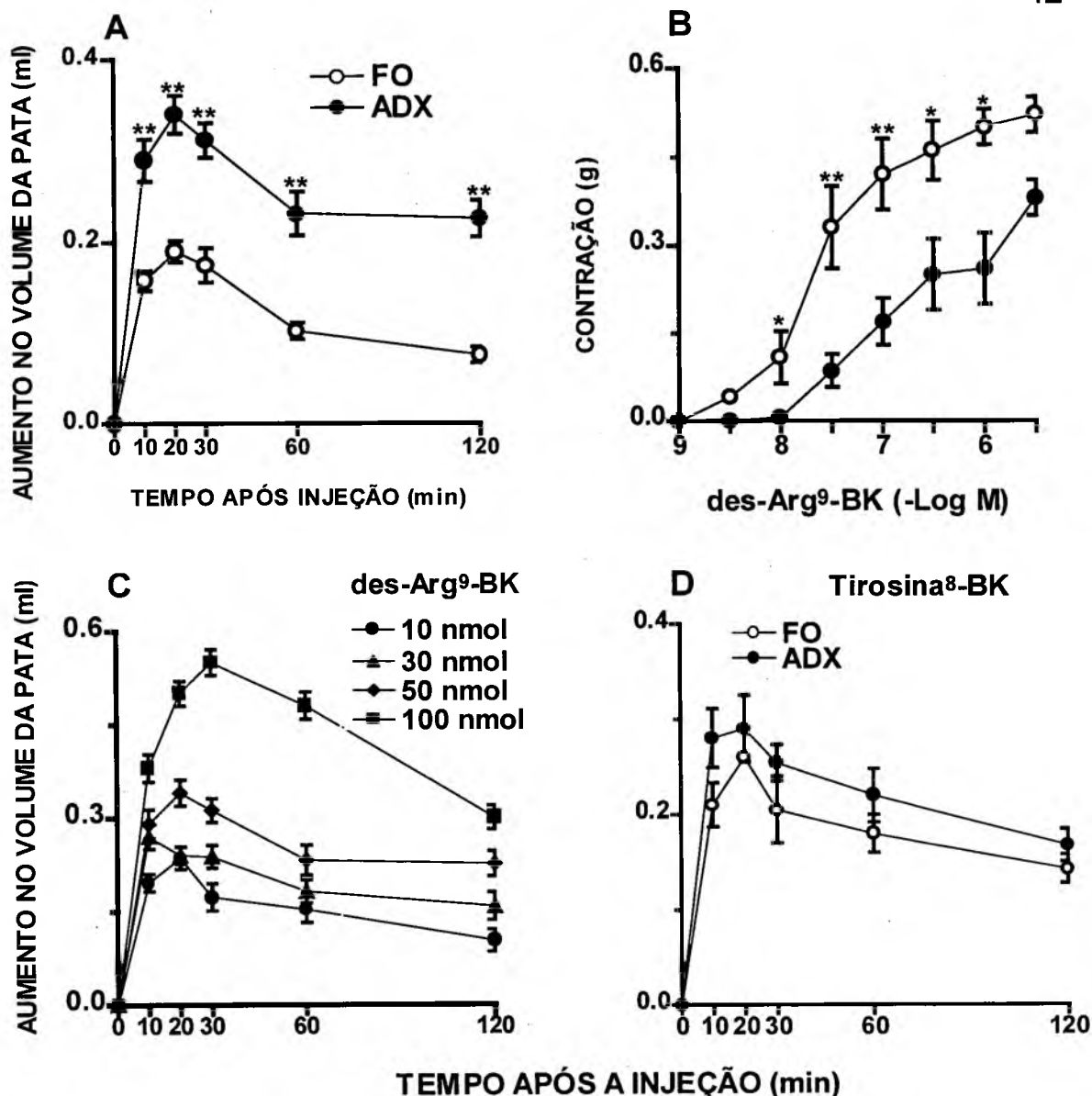


Figura 1 – Efeito da adrenalectomia sobre a resposta ao receptor B₁ em ratos. (A) Edema de pata em ratos FO ou ADX induzido pela injeção intraplantar da des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) 7 dias após a cirurgia. (B) Curva concentração-resposta média para a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM) na veia porta de ratos FO ou ADX 7 dias após a cirurgia, obtidos 1h30 após a montagem da preparação. (C) Curva dose-resposta para a des-Arg⁹-BK (10-100 nmol/pata) induzindo edema de pata em ratos ADX 7 dias após a cirurgia. (D) Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de tirosina⁸-BK (3 nmol/pata) em ratos FO ou ADX 7 dias. Os valores representam a diferença de volume (em ml) das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) ou com o agonista. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 5 a 7 ratos ou de 6 a 8 preparações. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado e análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Os resultados da figura 2A mostram que o edema causado pelo agonista seletivo de receptores B_1 apresenta-se aumentado somente a partir de 7 dias após a adrenalectomia dos animais. Este aumento da resposta edematogênica em decorrência da injeção de des-Arg⁹-BK é mantido por até 10 dias após a cirurgia e retorna aos valores basais a partir do 12^o e 14^o dia após a cirurgia (Figura 2B). Os resultados obtidos com animais FO não diferem dos resultados obtidos com os animais normais, sugerindo que a procedimento cirúrgico por si só não é capaz de causar alteração das respostas ao agonista B_1 . Complementando esses dados, alguns ratos foram castrados com o objetivo de verificar se outro procedimento cirúrgico, que não a adrenalectomia, poderia causar efeito semelhante sobre a resposta ao receptor B_1 para as cininas. O edema causado pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) não foi modificado entre os animais castrados e FO 7 dias antes (Figura 2C).

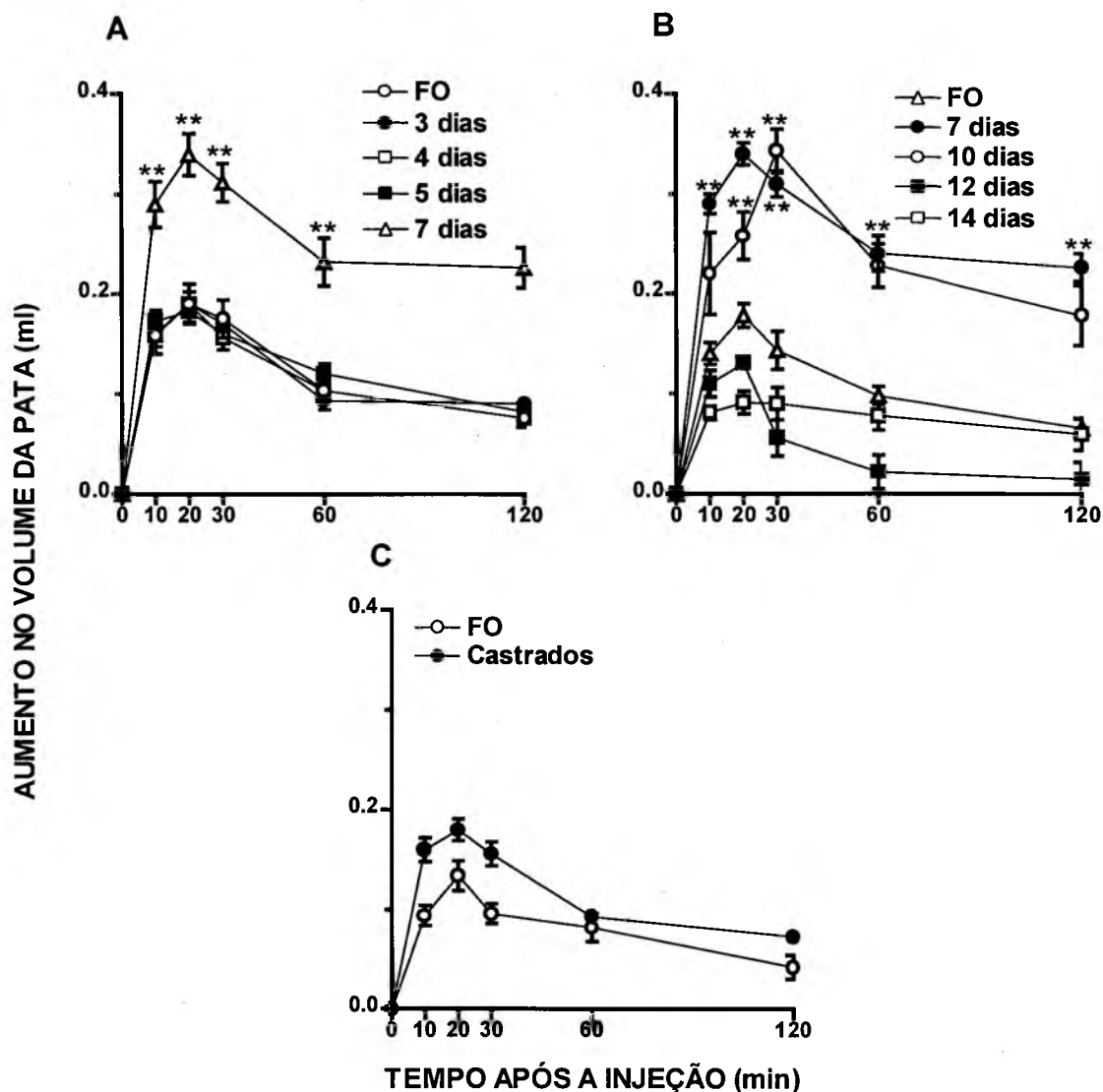


Figura 2 – Efeito do tempo de cirurgia de adrenalectomia ou da castração sobre a resposta edematogênica ao agonista seletivo B₁, des-Arg⁹-BK. (A) Edema de pata induzido pela injeção intraplantar da des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos FO ou ADX de 3 a 7 dias. (B) Edema de pata induzido pela injeção intraplantar da des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos FO ou ADX de 7 a 14 dias após a cirurgia. (C) Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos FO ou castrados 7 dias antes. Os valores representam a diferença de volume (em ml) das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) ou com o agonista. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 5 a 10 ratos. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas pelos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle **P<0.01 (teste "t" de Student não pareado e análise de variância ANOVA).

A co-injeção do antagonista seletivo para o receptor B₁, des-Arg⁹-NPC 17731 (30 nmol/pata), produziu inibição quase que completa do edema de pata (87±4%) induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos ADX 7 dias antes (Figura 3A). Ao contrário, o edema causado pela des-Arg⁹-BK não foi afetado pela co-injeção do antagonista seletivo para o receptor B₂, o HOE 140 (10 nmol/pata, dose que inibiu quase que completamente o edema de pata causado pela tirosina⁸-BK) (Figura 3B e resultados não apresentados). Da mesma maneira, a contração da veia porta induzida pela NA (1-300 nM) também não sofreu qualquer alteração quando os animais foram adrenalectomizados 7 dias antes (resultados não mostrados).

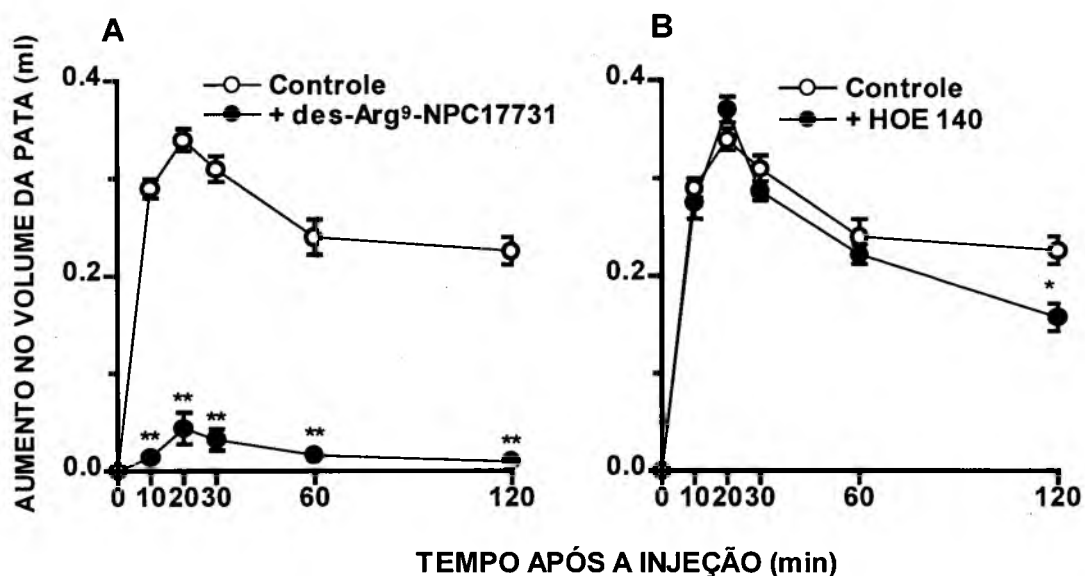


Figura 3 – Efeitos dos antagonistas seletivos dos receptores das cininas no edema de pata induzido pelo agonista B₁ em ratos ADX. Edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/kg) em ratos ADX 7 dias antes, tratados com salina (controle), ou com des-Arg⁹-NPC 17731 (30 nmol/pata) (A) ou com o HOE 140 (10 nmol/pata) (B). Os valores representam a diferença de volume (em ml) das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) ou com o agonista. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 5 a 7 ratos. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

O tratamento de ratos normais (não operados) com mitotano (1-1,6 g/kg/dia, v.o., por 10 dias), uma droga que reduz a síntese de corticóide devido à sua ação citotóxica sobre as células da glândula supra renal, resultou em um aumento marcante do edema de pata em relação ao grupo controle (R_{\max} mitotano $0,51 \pm 0,06$ vs salina $0,18 \pm 0,01$ ml) (Figura 4A). Além disso, o mesmo tratamento com mitotano causou aumento significativo da contração da veia porta induzida pela des-Arg⁹-BK em relação ao grupo controle (mitotano CE_{50} 42 nM e R_{\max} $0,63 \pm 0,05$ g vs salina CE_{50} 210 nM e R_{\max} $0,38 \pm 0,02$ g) (Figura 4B). O efeito do tratamento com mitotano foi essencialmente o mesmo que o observado nos ratos ADX, ou seja, ocorreu o aumento da resposta ao receptor B₁, tanto no edema de pata quanto na contração da veia porta.

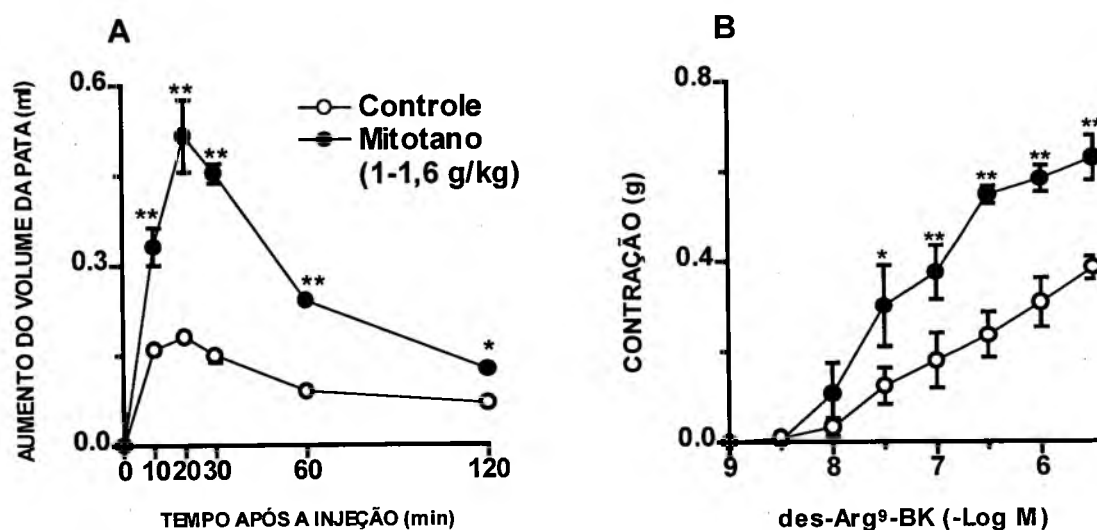


Figura 4 – Efeito do tratamento com mitotano sobre a resposta ao agonista do receptor B₁, des-Arg⁹-BK. (A) Edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos tratados durante 10 dias com salina (controle) ou com mitotano (1-1,6 g/kg, v.o.). Os valores representam as diferenças entre os volumes das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) e as injetadas com o agonista B₁. (B) Curvas concentração-resposta médias para a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM) na veia porta isolada de ratos tratados por 10 dias com salina (controle) ou mitotano (1-1,6 g/kg, v.o.). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 ratos. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas pelos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (teste “t” de Student).

4.2. Efeito da adrenalectomia sobre a expressão do RNA codificador para o receptor B₁ no pulmão de ratos

Sete dias após a remoção das glândulas adrenais foi observada uma indução importante da expressão do RNA do receptor B₁ no tecido pulmonar (Figura 4). O RNA do receptor B₁ foi observado nos pulmões de animais ADX 5, 6 e 7 dias após a cirurgia, sendo que o aumento da banda para o receptor B₁ mostrou ser mais intenso no 7^o dia após a adrenalectomia (Figura 5A). A quantificação das bandas confirmou o aumento significativo do RNA do receptor B₁, causado pela ausência de corticóides endógenos, especialmente nos animais cujas adrenais foram removidas 7 dias antes dos experimentos (Figura 5B).

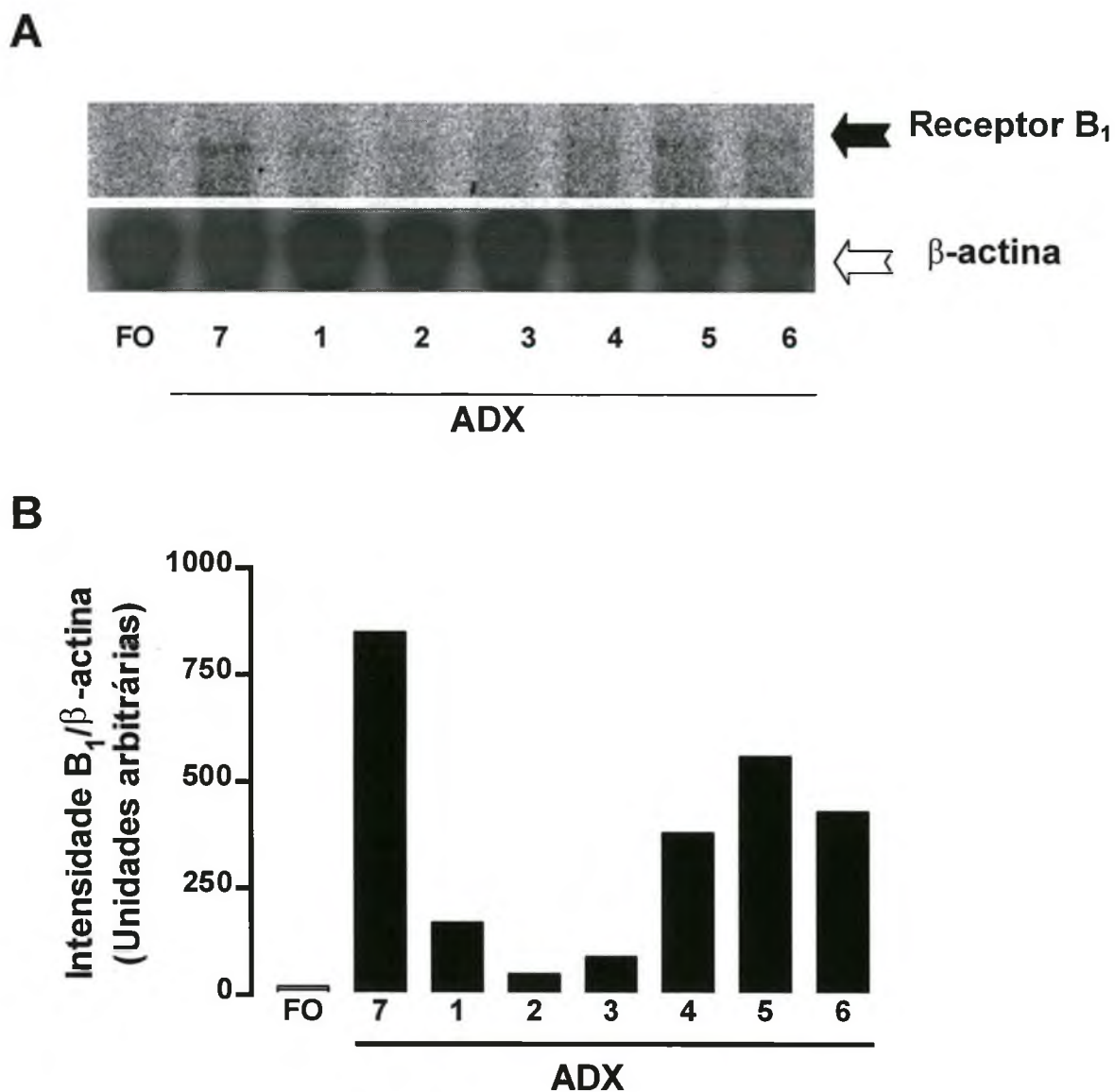


Figura 5 – Quantificação do RNA do receptor B₁ em pulmão de ratos adrenalectomizados. (A) Ensaio de proteção à RNase demonstrando a indução dependente do tempo do RNA do receptor B₁ causado pela adrenalectomia prévia dos animais. (B) Quantificação da intensidade das bandas do ensaio de proteção à ribonuclease. O RNA para a β -actina serviu como controle interno. 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 referem-se aos dias após a adrenalectomia. Representativo de 3 experimentos.

4.3. Influência da adrenalectomia sobre o edema induzido por outros agentes inflamatórios

Para analisar a influência da adrenalectomia em um processo edematogênico mais amplo, foram avaliados os edemas induzidos pela carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$) ou dextrana (100 $\mu\text{g/pata}$) em ratos ADX 7 dias após a cirurgia. Tanto o edema causado pela carragenina quanto pela dextrana foram significativamente aumentados nos animais ADX 7 dias antes, quando comparado com os animais FO (Figura 6).

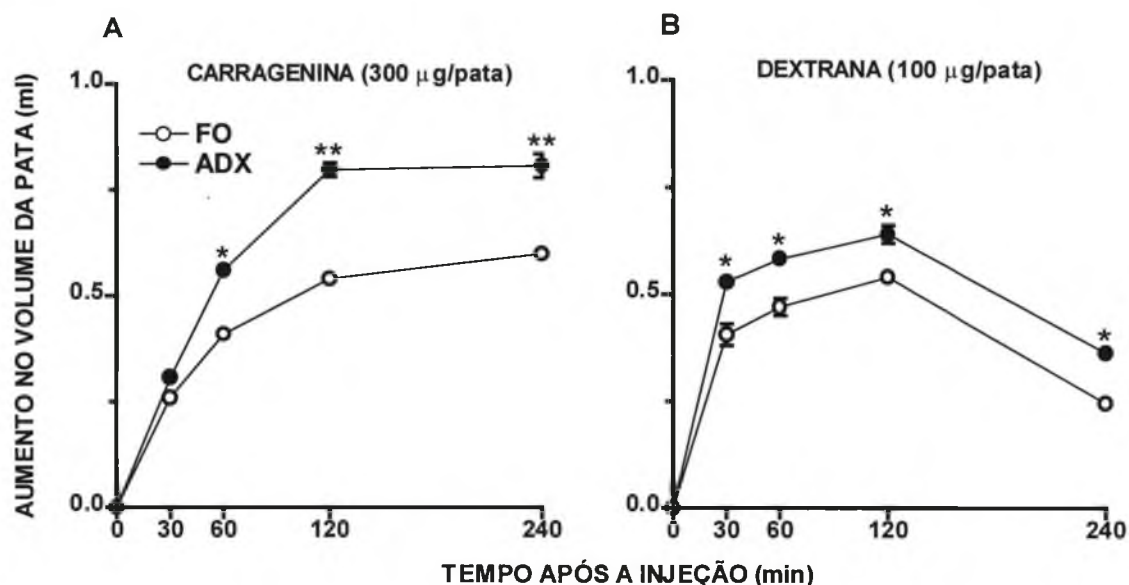


Figura 6 – Influência da adrenalectomia no edema de pata induzido pela carragenina ou pela dextrana. Edema de pata causado pela carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$) (A) ou dextrana (100 $\mu\text{g/pata}$) (B) em ratos FO ou ADX 7 dias antes. Os valores representam as diferenças entre os volumes das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) ou com o agente flogístico. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 ratos. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (teste “t” de Student não pareado).

4.4. Envolvimento da COX e do fator de transcrição NF- κ B na indução do receptor B₁ em animais ADX

O tratamento de ratos ADX, 7 dias após a cirurgia, com o inibidor da COX-2, meloxicam (3 mg/kg, i.p., 1 h antes), causou inibição significativa da formação do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (54 ± 4%) (Figura 7B). Entretanto, o tratamento de outros animais ADX do mesmo grupo com o inibidor não seletivo da COX, indometacina (2 mg/kg, i.p., 1 h antes) produziu apenas uma inibição discreta do edema induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) (Figura 7C).

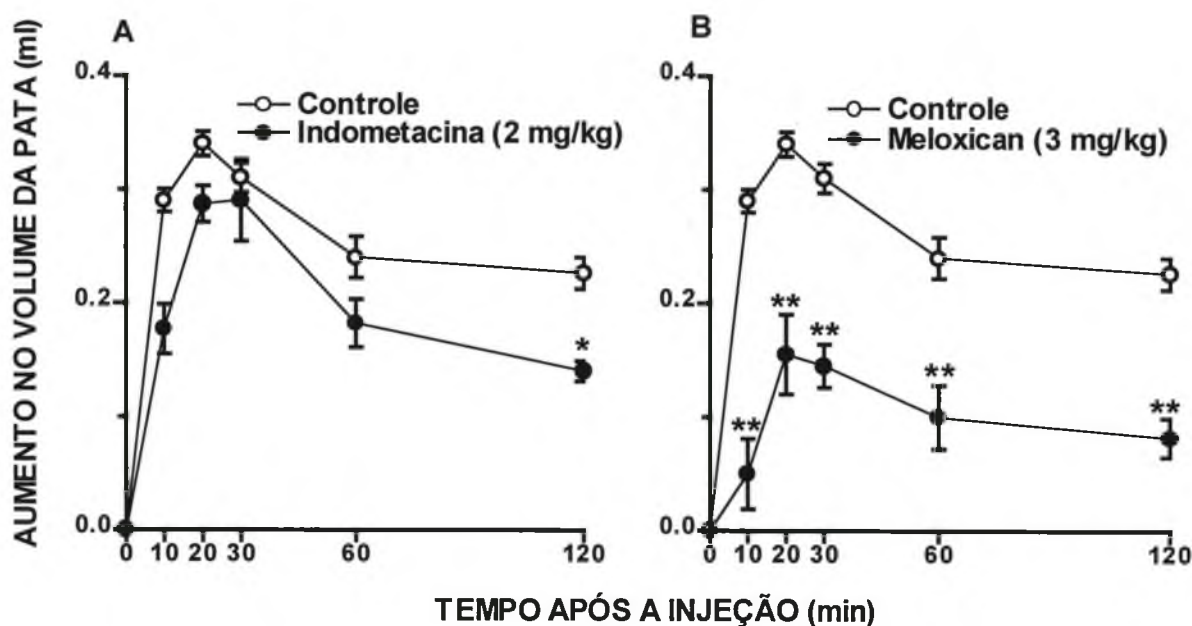


Figura 7 – Efeito dos inibidores da COX sobre a resposta edematogênica causada pelo agonista B₁ em animais ADX. Edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/kg) em ratos ADX, 7 dias após a cirurgia pré-trados com salina (controle) ou indometacina (2 mg/kg) (A) ou meloxicam (3 mg/kg) (B). Os valores representam a diferença de volume (em ml) das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) ou com o agonista. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 5 a 7 ratos. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., uma vez ao dia durante 6 dias consecutivos) resultou em significativa inibição do aumento do edema causado pela des-Arg⁹-BK (80 ± 2%), bem como da contração da veia porta (R_{\max} 0,31 ± 0,07 g), induzidos 7 dias após a adrenalectomia dos animais (Figura 8A e C). O edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos ADX 7 dias antes também foi inibido de maneira significativa pelo tratamento prévio dos animais com um inibidor da ativação do NF-κB, o PDTC (100 mg/kg/dia, i.p.), administrado uma vez ao dia durante 6 dias consecutivos, após a realização da cirurgia (82 ± 3%) (Figura 8B). Novamente, quando avaliado sobre a resposta contrátil da veia porta de rato, o tratamento dos animais com PDTC reduziu significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (R_{\max} de 0,52 ± 0,03 g reduzida para 0,35 ± 0,04 g) nos animais ADX (Figura 8D). Curiosamente, o tratamento de ratos ADX com a associação de doses sublimiáres de dexametasona (0,05 mg/kg, s.c.) e PDTC (10 mg/kg, i.p.) por 6 dias (doses essas que, quando empregadas isoladamente, não apresentam efeito, resultados não mostrados), reduziu significativamente o edema causado pela des-Arg⁹-BK (82 ± 5%), bem como a contração da veia porta induzida pela des-Arg⁹-BK (R_{\max} 0,34 ± 0,08 g) nos animais ADX 7 dias antes (Figura 9A e B).

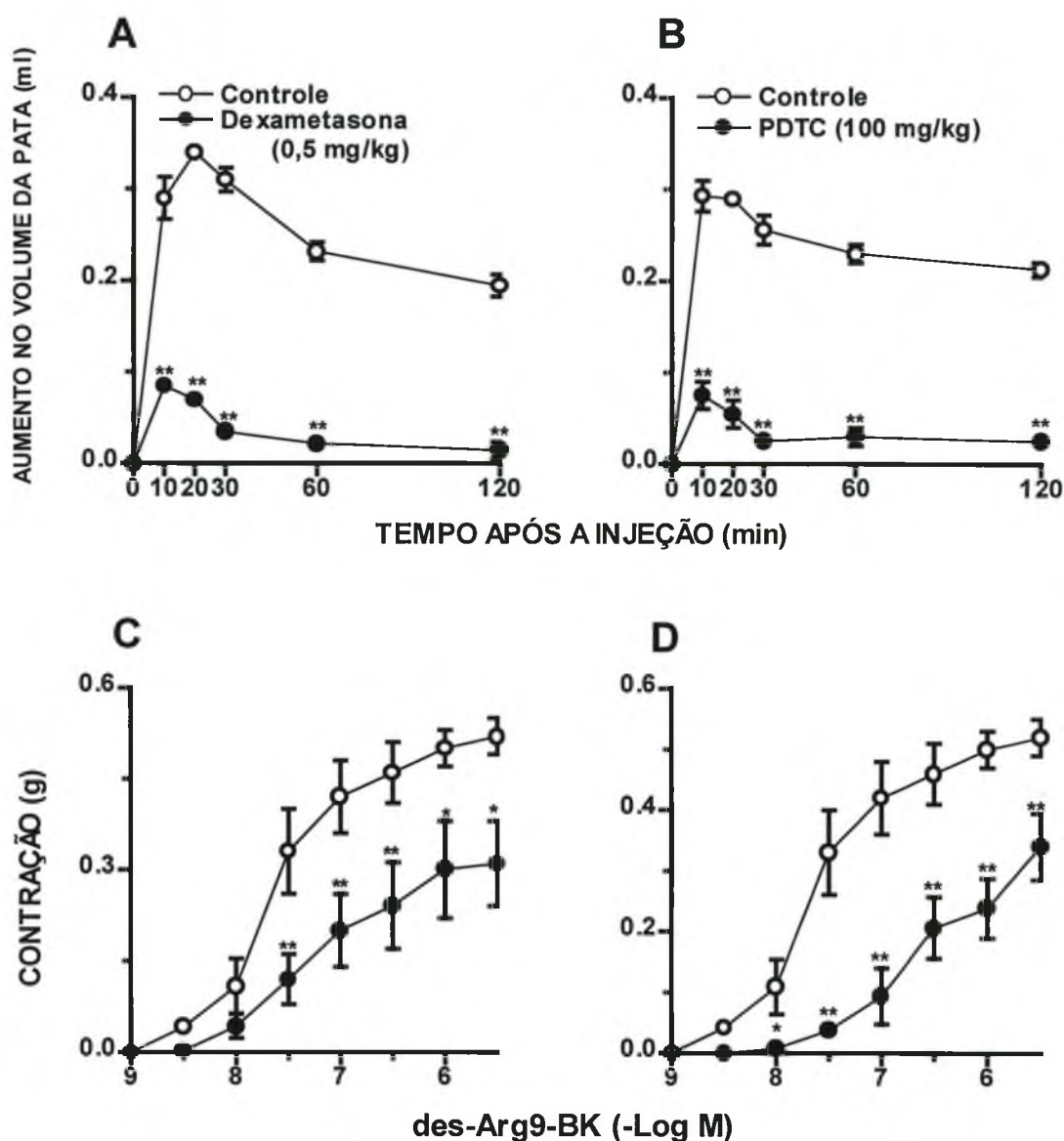


Figura 8 – Influência do tratamento dos animais ADX com dexametasona e com o inibidor do NF- κ B. Edema de pata induzido pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos, 7 dias após a adenalectomia, tratados durante 6 dias com salina (controle), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) (A) ou PDTC (100 mg/kg, i.p.) (B). Curvas concentração-resposta médias obtidas para a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM) induzindo contração da veia porta isolada de ratos ADX 7 dias, tratados durante 6 dias consecutivos com salina (controle), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) (C) ou PDTC (100 mg/kg, i.p.) (D). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 ratos ou 6 a 8 preparações. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

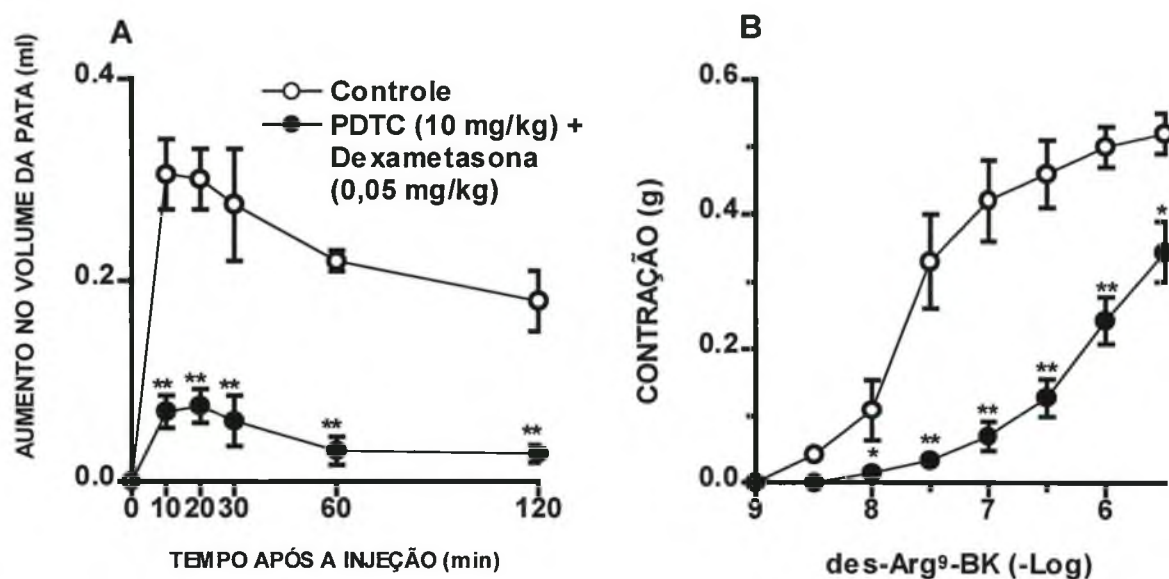


Figura 9 – Efeito sinérgico entre a dexametasona e o inibidor do NF- κ B o aumento da resposta ao receptor B₁ em animais ADX. (A) Edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK (50 nmol/pata) em ratos ADX, 7 dias após a cirurgia, tratados durante 6 dias com salina (controle), ou com a associação de dexametasona (0,05 mg/kg, s.c.) e PDTC (10 mg/kg, i.p.). Os valores representam as diferenças entre os volumes das patas injetadas com veículo (0,1 ml de PBS) e com as drogas. (B) Curvas concentração-resposta médias para a des-Arg⁹-BK (1-3000 nM) induzindo contração da veia porta de ratos ADX tratados por 6 dias com salina (controle) ou com a associação de dexametasona (0,05 mg/kg, s.c.) e PDTC (10 mg/kg, i.p.). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 a 7 ratos ou 6 a 8 preparações. Em alguns pontos as barras dos erros padrão estão sobrepostas aos símbolos. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

4.5. Ensaio do deslocamento em gel com o oligonucleotídeo consenso para o fator de transcrição NF- κ B

A Figura 10A mostra os resultados obtidos no ensaio de deslocamento em gel referente a ligação DNA/NF- κ B utilizando o extrato nuclear de pulmão obtido de ratos FO ou ADX (1 a 7 dias antes). Os extratos nucleares dos pulmões de ratos tratados com LPS foram utilizados como controle positivo do ensaio para a ligação DNA/NF- κ B. Os níveis basais da ligação DNA/NF- κ B no extrato nuclear do pulmão de ratos FO foram praticamente inexistentes (Figura 10A). Cinco dias após a retirada das adrenais, ocorreu aumento no nível da ligação DNA/NF- κ B, efeito este que se mostrou mais intenso nos ratos ADX 7 dias (Figura 10A). A formação dos complexos proteína/DNA obtidos com o extrato nuclear de pulmão de ratos ADX, 7 dias após a cirurgia, foram deslocados na presença de excesso do oligonucleotídeo consenso para o NF- κ B, mas não foi alterado pelo oligonucleotídeo para o TFIID, demonstrando especificidade na interação proteína da amostra/DNA (Figura 10B). A ativação do NF- κ B nos tecidos de animais ADX também foi confirmada quando os experimentos foram conduzidos com extratos nucleares obtidos das patas e do coração de animais FO e ADX 7 dias (Figura 10C). Na Figura 10D observa-se que o tratamento de ratos ADX 7 dias antes com dexametasona, PDTC ou com a associação de baixas doses das duas drogas durante 6 dias, causou inibição da ativação do NF- κ B induzida pela adrenalectomia.

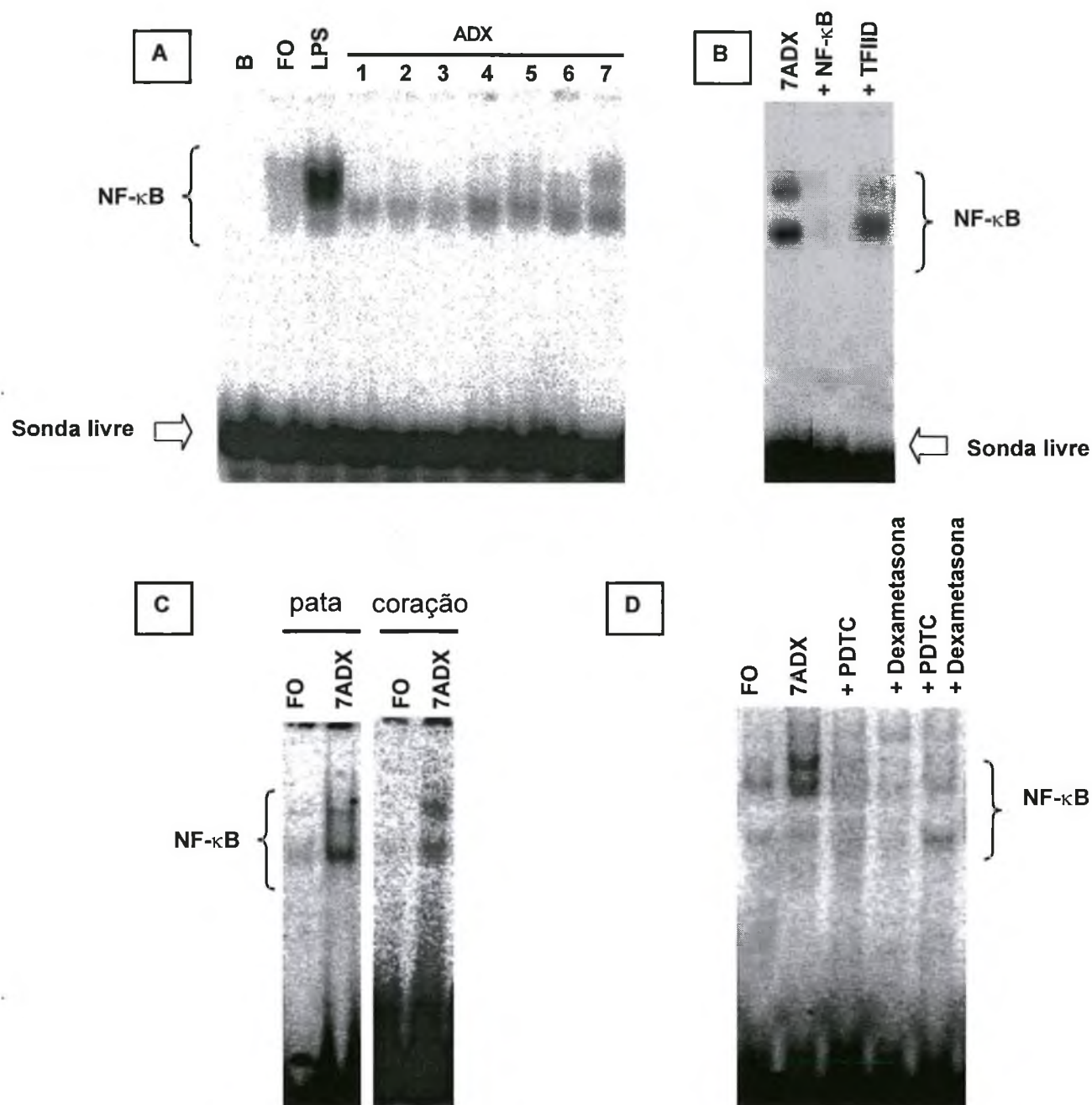


Figura 10 – Detecção da ativação do fator de transcrição NF- κ B pela adrenalectomia em ratos. (A) Ensaio de deslocamento da ligação em gel com extratos nucleares extraídos dos pulmões de ratos tratados com LPS (8 mg/kg, i.p., 60 min antes), utilizado como controle positivo da técnica, ou ratos FO ou ADX com 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias. (B) Ensaio de competição utilizando extrato nuclear dos pulmões de ratos ADX, 7 dias após a cirurgia, na ausência (ADX 7) ou na presença do oligonucleotídeo para o NF- κ B não marcado (0,9 pmol) (+NF- κ B) ou do oligonucleotídeo para TFIID (0,9 pmol) (+TFIID). (C) Ensaio de deslocamento da ligação em gel mostrando a influência da adrenalectomia sobre a ativação do NF- κ B em tecidos obtidos da pata e do coração de ratos. (D) Efeito do tratamento de ratos ADX *in vivo* com diferentes inibidores da via do NF- κ B no extrato nuclear dos pulmões. A posição do complexo DNA/NF- κ B e da sonda livre estão indicados nas figuras. Foram realizados 3-4 ensaios para cada protocolo.

4.6. Indução do receptor B₁ por incubação *in vitro* da aorta isolada de coelho

Como descrito anteriormente (DeBlois et al., 1989), a adição da concentração máxima de des-Arg⁹-BK (1 µM) não causou qualquer efeito contrátil quando aplicada 1 h após o início da incubação *in vitro* da aorta de coelho (resultados não mostrados). Entretanto, quando os experimentos foram realizados 2, 4 ou 6 h após a montagem das preparações, ocorreu um aumento significativo e dependente do tempo da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK. Quando as respostas foram calculadas como percentagem da contração induzida pelo KCl (40 mM), a contração causada pela des-Arg⁹-BK corresponde a aproximadamente 8 ± 2 , 26 ± 3 e $38 \pm 4\%$, quando analisada 2, 4 e 6 h após a montagem das preparações, respectivamente.

Quando as preparações foram continuamente incubadas com inibidores da COX-2, o NS-398 (1 µM) ou com o DFU (1 µM), em concentrações dessas drogas que não afetaram o tônus da preparação *per se*, observou-se redução significativa do aumento dependente do tempo da contração induzida pela des-Arg⁹-BK, sem afetar, no entanto, a resposta para a NA (1 µM) (Figura 11B e C). O mesmo efeito inibitório sobre o aumento dependente do tempo foi obtido com o inibidor não seletivo da COX, a indometacina (30 µM), que reduziu em $42 \pm 1\%$ a contração induzida pela des-Arg⁹-BK em 6 h (Figura 11A). Ao contrário, o piroxicam (100 µM), um inibidor com alguma seletividade para a COX-1, em concentração que foi efetivo em inibir a contração induzida pela BK na vesícula biliar de cobaia ($61 \pm 6\%$) - efeito mediado pela liberação de prostanóides (Cabrini et al., 1995) -, não foi capaz de alterar a contração induzida pela des-

Arg⁹-BK na aorta de coelho (Figura 11D). Tanto a indometacina quanto o piroxicam, nas concentrações utilizadas, não tiveram qualquer efeito sobre a resposta da NA (Figura 11A e D).

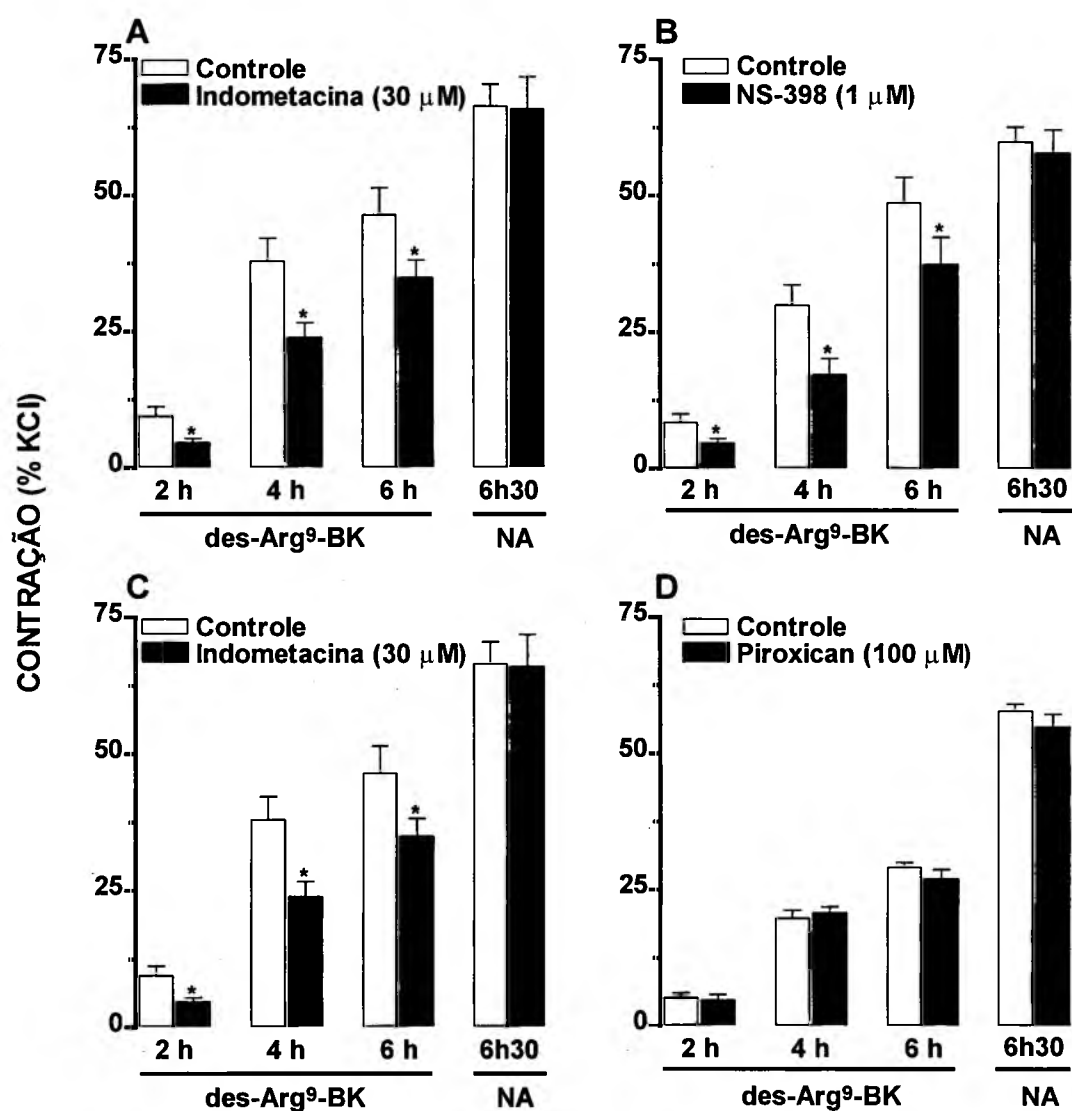


Figura 11 – Efeito dos inibidores da COX-2 sobre a indução do receptor B₁ causado pela incubação *in vitro* de anéis de aorta de coelho. Os tecidos foram continuamente incubados com os seguintes inibidores: (A) Indometacina (30 μ M), (B) NS-398 (1 μ M), (C) DFU (1 μ M), (D) Piroxicam (100 μ M) ou apenas com o veículo (controle) e a des-Arg⁹-BK foi aplicada 2, 4 e 6 h após a montagem das preparações, sendo que a noradrenalina (NA, 1 μ M) 6h30 h após. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando comparados os resultados obtidos das preparações incubadas com os inibidores em relação aos dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste "t" de Student não pareado).

Em outro grupo experimental foi avaliado o possível envolvimento da proteína quinase C na contração dependente do tempo induzida pela des-Arg⁹-BK. Os inibidores da proteína quinase C, RO 318220 (1 μ M) ou estaurosporina (100 nM), incubados por 6 h, não afetaram o tônus da preparação mas causaram uma redução significativa da contração dependente do tempo induzido pela des-Arg⁹-BK (Figura 12A e B). Além disso, foram incapazes de causar qualquer alteração significativa sobre a resposta contrátil para a NA (Figura 12A e B). A presença constante da genisteína (30 μ M, inibidor da tirosina quinase) no banho inibiu significativamente a contração dependente do tempo induzida pela des-Arg⁹-BK (Figura 12C). Da mesma forma, a contínua incubação das preparações com tirfostin B42 (100 μ M, inibidor da tirosina quinase JAK), em concentração que não teve efeito *per se* sobre as preparações, reduziu em $54 \pm 2\%$ a contração induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelho (Figura 12D). Como ilustrado na figura 13, a presença constante nas preparações de inibidores do NF- κ B, como PDTC (300 μ M), TLCK (30 μ M) ou sulfasalazina (300 μ M), causou inibição significativa do aumento da resposta contrátil dependente do tempo para a des-Arg⁹-BK na aorta de coelho. O PDTC causou a maior inibição ($64 \pm 1\%$) da contração induzida pela des-Arg⁹-BK (Figura 13A). A sulfasalazina, na concentração usada, também alterou significativamente a resposta contrátil induzida pela NA (Figura 13C). Entretanto, as duas drogas falharam em interferir no tônus das preparações.

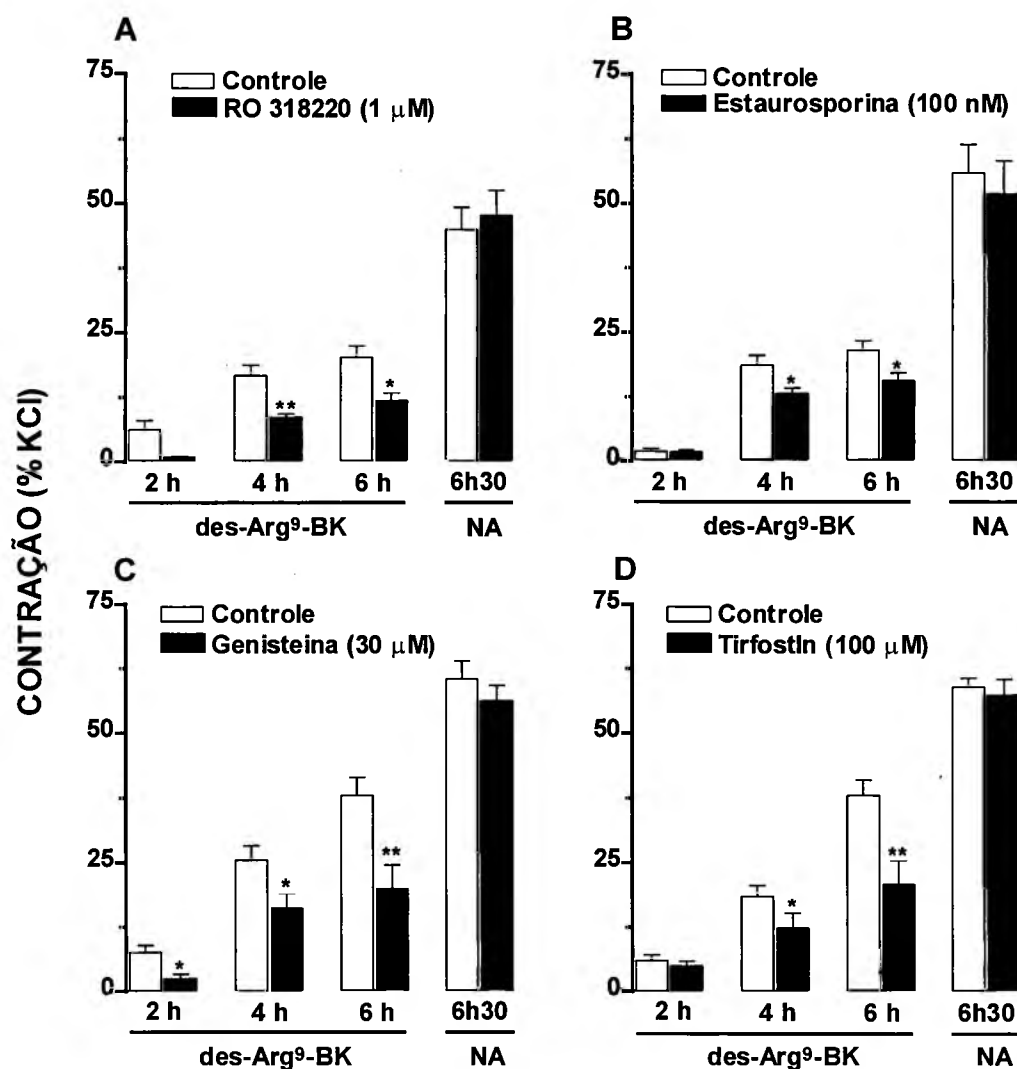


Figura 12 – Efeito de inibidores da ativação de proteínas quinases sobre a indução do receptor B_1 causado pela incubação *in vitro* de anéis de aorta de coelho. Os tecidos foram continuamente incubados com um dos seguintes inibidores: (A) RO 318220, (B) estaurosporina, (C) genisteína, (D) tirfostin ou apenas com o veículo (controle) e a des-Arg⁹-BK foi aplicada 2, 4 e 6 h após a montagem das preparações, enquanto a NA (1 μM) foi aplicada 6h30. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos das preparações com os inibidores são comparados com os dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

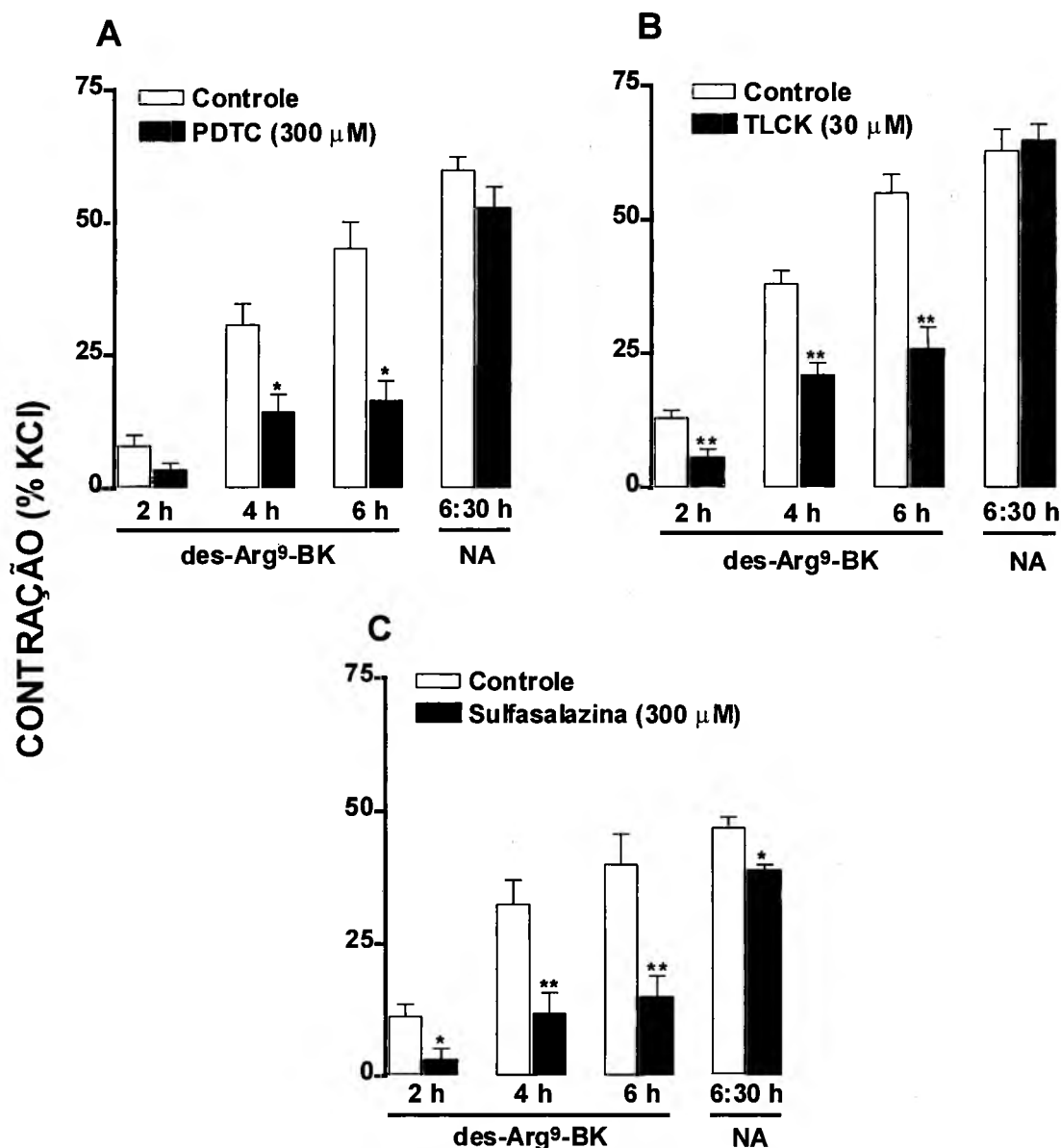


Figura 13 – Efeito da inibição da ativação do fator nuclear NF- κ B sobre a indução do receptor B₁ causado pela incubação *in vitro* de anéis de aorta de coelho. Os tecidos foram continuamente incubados com um dos seguintes inibidores: (A) PDTC, (B) TLCK, (C) sulfasalazina ou apenas com o veículo (controle) e a des-Arg⁹-BK foi aplicada 2, 4 e 6 h após a montagem das preparações, enquanto NA (1 μ M) foi aplicada 6h30. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos das preparações com os inibidores são comparados com os dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01

Com o objetivo de explorar mais detalhadamente o mecanismo através do qual essas drogas estão inibindo o aumento da expressão do receptor B₁, em outra série de experimentos, foi analisada a associação de duas drogas incubadas simultaneamente no mesmo banho. A associação de DFU (1 μM) com o TLCK (30 μM) reduziu de maneira expressiva (65 ± 3%) o aumento dependente do tempo da contração induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelho (Figura 14A). Outras associações também foram testadas, tal como DFU com indometacina, TLCK com DFU e genisteína. Todos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente o aumento da contração relacionada com a indução do receptor B₁ na aorta isolada de coelho (Figura 14B e C), sem interferir, contudo, na resposta contrátil à NA. Nenhuma dessas associações apresentou um efeito de adição, uma vez que não foram capazes de inibir completamente a resposta à des-Arg⁹-BK.

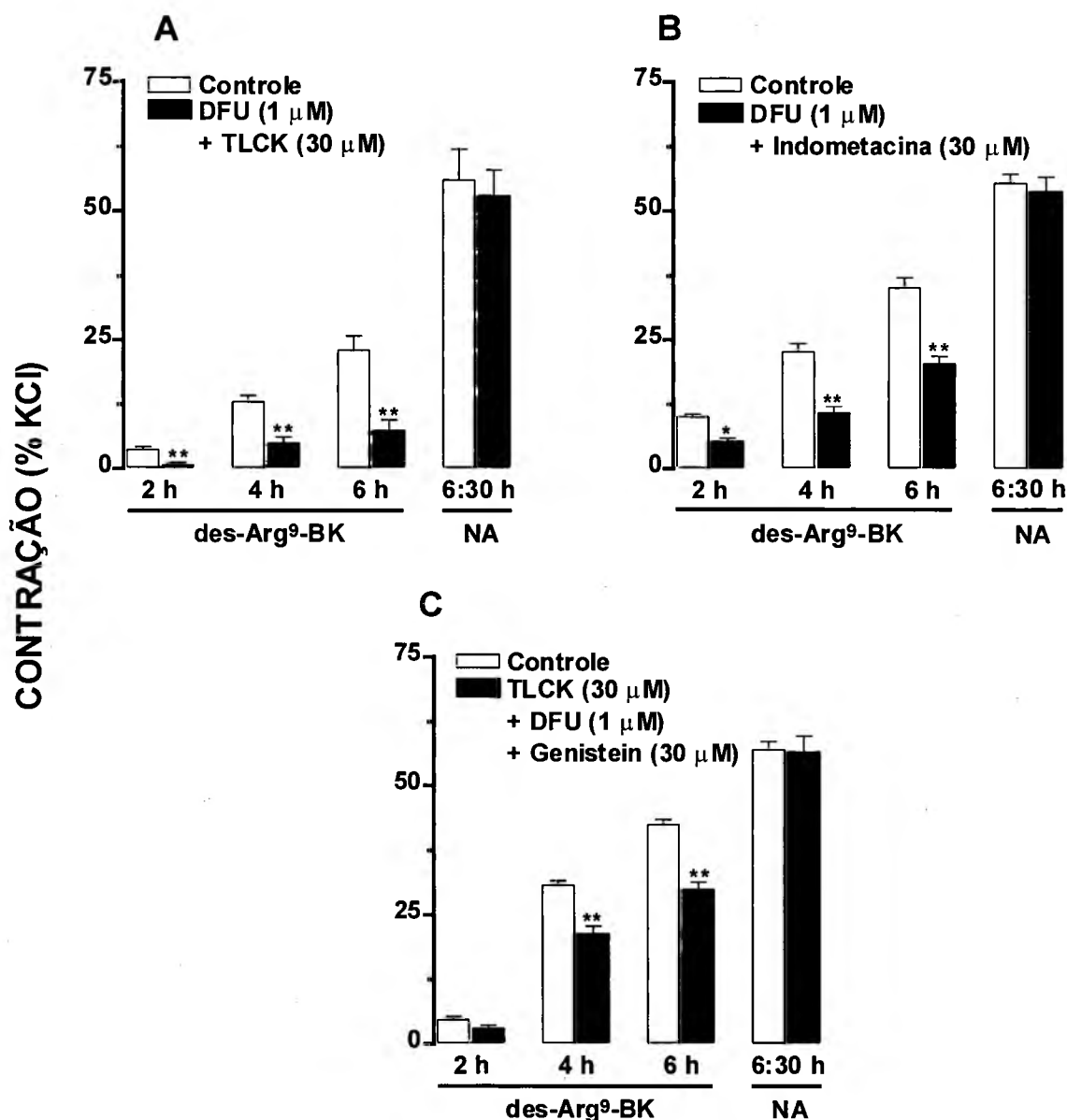


Figura 14 – Efeito da associação de vários inibidores sobre a indução do receptor B₁ causado pela incubação *in vitro* de anéis de aorta de coelho. Os tecidos foram continuamente incubados com a associação dos seguintes inibidores: (A) DFU e TLCK, (B) DFU e indometacina, (C) TLCK, DFU e genistein ou apenas com o(s) veículo(s) (controle) e a des-Arg⁹-BK foi aplicada 2, 4 e 6 h, enquanto a NA (1 μ M) foi aplicada 6h30 h após a montagem das preparações. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos das preparações com os inibidores são comparados com os dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

Visando analisar o efeito dos inibidores testados sobre os mecanismos de transdução envolvidos na resposta posterior à ativação do receptor B_1 pelo seu agonista, as preparações foram contraídas com a des-Arg⁹-BK após o receptor ter sido completamente induzido nos anéis de aorta isolada de coelho (5h30 após a montagem). Somente após a confirmação da resposta, é que as preparações foram expostas aos inibidores (por 30 min) e novamente expostas ao agonista B_1 . A incubação dos tecidos com indometacina, NS-398, DFU, piroxicam, RO318220, genisteína, estaurosporina, tirfostin B42, PDTC ou TLCK, nas mesmas concentrações que foram capazes de inibir a indução dependente do tempo para o agonista do receptor B_1 , não foi capaz de afetar a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (Tabela 1). Somente a sulfasalazina reduziu significativamente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK, efeito que foi revertido completamente após a lavagem das preparações (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito de diversas drogas (incubação de 30 min) sobre a contração induzida pela des-Arg⁹-BK (1 μ M) 6 h após a montagem das preparações de aorta de coelho.

Droga	Concentração	R_{max} (% KCl 40 mM)
Controle	-	38,1 \pm 4,2
PDTC	300 μ M	37,4 \pm 6,0
Sulfasalazina	300 μ M	12,4 \pm 3,0*
TLCK	30 μ M	33,1 \pm 3,4
Tirfostin	100 μ M	44,5 \pm 3,6
Genisteina	30 μ M	37,5 \pm 2,9
RO 318220	1 μ M	40,0 \pm 3,1
Estaurosporina	100 nM	37,7 \pm 2,7
Indometacina	30 μ M	34,8 \pm 2,7
DFU	1 μ M	36,5 \pm 4,0
NS-398	1 μ M	32,3 \pm 3,8

R_{max}, resposta máxima de contração induzida pela des-Arg⁹-BK 6 h após a montagem das preparações, na ausência (controle) ou na presença de um inibidor.

*P < 0.05, Teste t de Student

4.7. Indução do receptor B₁ por LPS

Nas preparações obtidas de coelhos tratados com LPS (50 µg/kg, i.v.) 12 h antes, o aumento da contração à des-Arg⁹-BK dependente do tempo foi significativamente aumentado quando comparado com os resultados obtidos nas preparações extraídas de animais tratados com salina (Figura 15A). O tratamento *in vivo* dos animais com PDTC (50 mg/kg, i.p.) logo após o tratamento com LPS, resultou em uma grande redução na contração induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta *in vitro* (Figura 15B). Entretanto, o tratamento dos animais com PDTC também causou redução significativa da resposta contrátil para a NA (Figura 15B). Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento prévio dos animais com dexametasona (0,4 mg/kg, s.c.) que reduziu em 46 ± 5% a contração à des-Arg⁹-BK (Figura 15C). No entanto, esse tratamento não alterou a resposta à NA (Figura 15D). Uma inibição mais sutil sobre o aumento da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK foi observada nas preparações obtidas de coelhos tratados com um inibidor da tirosina quinase, a genisteína (5 mg/kg, i.p.) (Figura 15D). Nem a genisteína nem a dexametasona foi capaz de alterar a resposta mediada pela NA (Figura 15C e D). A associação de doses sublimiares de dexametasona (0,04 mg/kg, s.c.) e PDTC (5 mg/kg, i.p.) (que isoladamente não exerceram qualquer efeito inibitório sobre a contração mediada pela des-Arg⁹-BK), causou expressiva inibição (65 ± 5%) da contração induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelhos pré-tratados com LPS, sem modificar a resposta à NA (Figura 16).

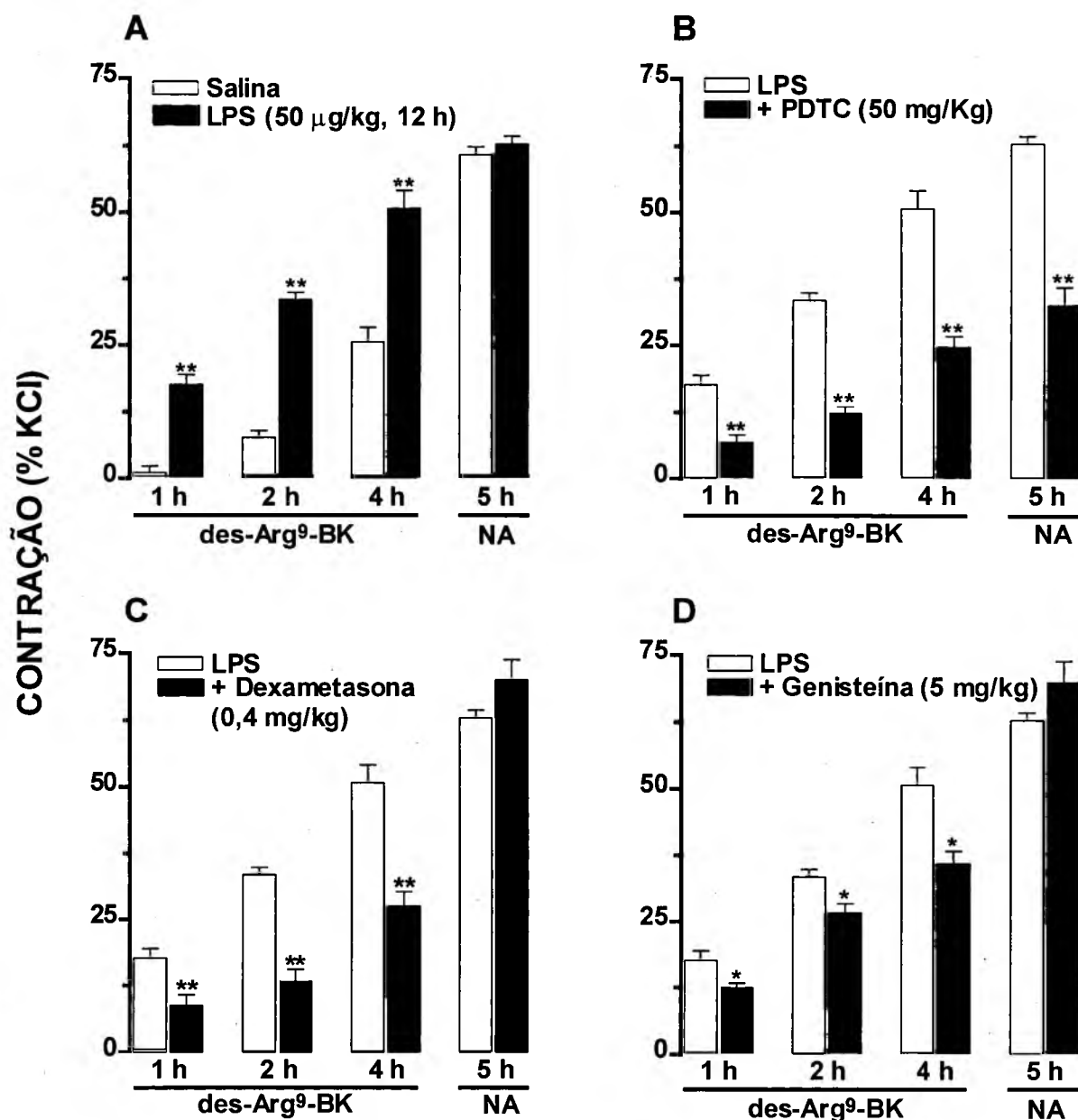


Figura 15 – Experimentos ex vivo com coelhos tratados previamente com LPS seguido por inibidores. Efeito do pré-tratamento dos animais com salina ou LPS (50 µg/kg, 12 h antes, i.v.) (A) ou LPS associado com PDTC (50 mg/kg, i.p.) (B), genisteína (5 mg/kg, i.p.) (C) ou dexametasona (0,4 mg/kg, s.c.) (D). Os tecidos foram submetidos à contração induzida pela des-Arg⁹-BK (1 µM) 1, 2 e 4 h, e a NA (1 µM) 5 h após a montagem das preparações. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos das preparações com os inibidores são comparados com os dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle *P<0.05; **P<0.01 (teste “t” de Student não pareado).

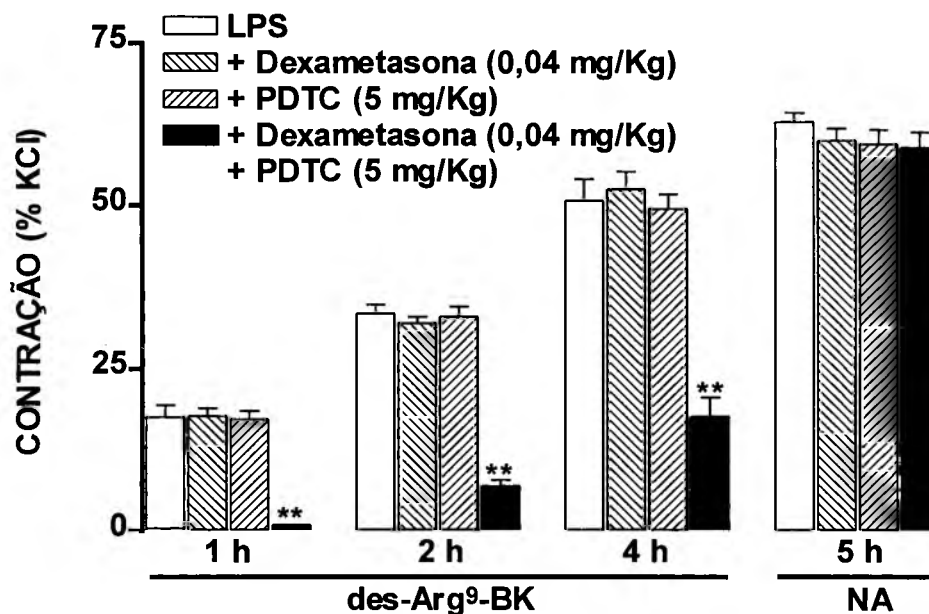


Figura 16 - Experimentos *ex vivo* com coelhos tratados previamente com LPS e a associação de dexametasona com o inibidor do NF- κ B, o PDTC. Efeito do pré-tratamento dos animais com LPS (50 μ g/kg, 12 h antes, i.v.) com veículo (controle) ou com a associação de PDTC (50 mg/kg, i.p.) e dexametasona (0,4 mg/kg, s.c.). Os tecidos foram submetidos à contração induzida pela des-Arg⁹-BK (1 μ M) 1, 2 e 4 h, e a NA (1 μ M) 5 h após a montagem das preparações. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa quando os resultados obtidos das preparações com os inibidores são comparados com os dados das preparações tratadas com veículo. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6 a 8 preparações. Significativamente diferentes dos valores controle **P<0.01 (teste "t" de Student não pareado).

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram consideráveis evidências farmacológicas e moleculares sugerindo que os glicocorticóides endógenos exercem um papel importante no controle da expressão do receptor B₁ em ratos, tanto em experimentos realizados *in vivo* quanto *in vitro*. Também foi mostrado no presente estudo que os tratamentos *in vitro* e *ex vivo* com inibidores do NF- κ B e de quinases, como tirosina quinase, proteína quinase C e de produtos derivados da ação da enzima COX-2, são capazes de prevenir significativamente o aumento da contração dependente do tempo para o agonista seletivo dos receptores B₁ na aorta isolada de coelho. Tais resultados estendem os conhecimentos funcionais e moleculares acerca dos mecanismos que regulam a indução do receptor B₁.

Os glicocorticóides são hormônios esteroidais secretados pelas glândulas adrenais em resposta a diversos estímulos fisiológicos e ambientais. Esses hormônios atuam em múltiplos alvos e podem aumentar ou inibir várias atividades celulares, causando alterações necessárias à sobrevivência, como alterações metabólicas, endócrinas, nervosas, cardiovasculares, imunológicas, entre outras. Dessa forma, não é surpreendente que a regulação do nível sanguíneo dos glicocorticóides esteja ligada a diversos estímulos sensoriais, e esta informação aparece integrada ao hipotálamo (Turnbull e Rivier, 1999). O núcleo primário do sistema nervoso central (SNC) envolvido na regulação do eixo adrenal-pituitária é o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. O NPV é a principal fonte do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no SNC, que, por

sua vez, é o principal regulador fisiológico da secreção de adrenocorticotrofina (ACTH), o hormônio da pituitária (Rivier e Plotsky, 1986). Os neurônios do NPV liberadores de CRH se projetam para a zona externa da eminência média e liberam o fator através de uma rede especializada de capilares. A pituitária anterior (ou adenohipófise) é irrigada por vasos que surgem dessa rede de capilares. Na pituitária anterior o CRH interage com receptores específicos na superfície da célula corticotrófica que são acoplados à proteína G, resultando na mobilização do peptídeo precursor do ACTH proopiomelanocortina e, posteriormente, na secreção do ACTH e outros peptídeos derivados do mesmo precursor (Turnbull e Rivier, 1997; Vale et al., 1981). O hormônio adenocorticotrófico induz potente secreção de glicocorticóides da zona fasciculata da córtex adrenal. Em humanos, o principal glicocorticóide endógeno é o cortisol, mas no rato e no camundongo, a corticosterona é o principal produto esteróide sintetizado na zona fasciculata. Através de mecanismos de *feedback* endócrino clássicos, estes esteróides inibem a síntese e a secreção de CRH no hipotálamo e do ACTH na glândula pituitária (Keller-Wood et al., 1983; Young et al., 1986).

A secreção basal dos hormônios glicocorticóides é necessária para a função normal da maioria dos tecidos, e mesmo pequenos desvios dos níveis circulantes desses esteróides produzem mudanças em uma grande variedade de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (para revisão ler Turnbull e Rivier, 1999). Os níveis sanguíneos dos glicocorticóides aumentam em resposta a estímulos que possam vir a ser uma ameaça para a homeostase corporal. Esses hormônios lipofílicos difundem-se livremente através de membranas celulares e ligam-se com alta afinidade a um receptor intracelular (para revisão ler Webster

e Cidlowski, 1999; Newton, 2000). O receptor para glicocorticóide é um fator de transcrição induzido pelo ligante, que é mantido na forma de complexo heteromérico 8S no citoplasma, através de interações com proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, 70, 90 e 56) (Beato, 1989; Pratt, 1994). Logo após a sua entrada na célula, os glicocorticóides se ligam com alta afinidade (na ordem de nM) aos seus receptores. Como consequência da interação ligante-receptor, o complexo receptor de glicocorticóide 8S se dissocia das proteínas de choque térmico na forma 4S e migra para o núcleo da célula. Na forma 4S o receptor é capaz de se ligar em sítios de alta afinidade presentes no genoma.

Uma vez ligado, o complexo glicocorticóide-receptor modula a expressão de genes por meio de mudanças na estrutura da cromatina e/ou pelo recrutamento de outros fatores transcricionais, facilitando assim sua ação (Giguere et al., 1986; Strahle et al., 1988; Beato, 1989; Pratt, 1994; Braseir e Li, 1996). Desta maneira, os glicocorticóides, atuando através de seus próprios receptores, também estão envolvidos na repressão de muitos genes e regulam um grande número de processos fisiológicos e patológicos, uma vez que são capazes de modular a síntese de mediadores antiinflamatórios, como a IL-10, lipocortina-1, antagonista do receptor da IL-1 e endopeptidase neutra, entre outros. A ativação de receptores de glicocorticóides também pode reprimir a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, enzimas, receptores, além de moléculas de adesão (Webster e Cidiowski, 1999; Newton, 2000).

Goujon e colaboradores (1996) demonstraram que a retirada de ambas glândulas adrenais causava um aumento da expressão gênica de IL-1 α e de IL-1 β no hipotálamo, hipocampo e no núcleo estriado de camundongos. Os mesmos autores sugeriram que os corticóides endógenos regulam os

componentes neurais da resposta do hospedeiro à infecção e inflamação por inibir a expressão de citocinas nos órgãos periféricos e no cérebro (Goujon et al., 1996). Demonstraram ainda que a adrenalectomia também aumentava a sensibilidade de camundongos ao choque séptico induzido pelo LPS (Bertini et al., 1988). Yang e colaboradores (1997) sugeriram que a exacerbação da artrite induzida por adjuvante em ratos ADX está associada com a redução da expressão de lipocortina 1 pelos leucócitos.

No presente trabalho, a ausência dos corticóides endógenos causou a indução do receptor B₁, uma vez que ratos ADX desenvolveram um aumento bastante significativo e dependente da dose do edema de pata em resposta à injeção intradérmica da des-Arg⁹-BK, agonista seletivo do receptor B₁, quando comparado com a resposta apresentada por animais FO. Assim, da mesma forma como foi descrito por Campos e Calixto (1995) a resposta edematogênica de ratos sem qualquer tratamento ou FO, à injeção intraplantar do agonista B₁ é muito modesta, principalmente quando comparado com o edema induzido pela tirosina⁸-BK, um agonista B₂. O mesmo efeito (i.e. bastante discreto) foi induzido pelo agonista B₁ em animais que sofreram outro tipo de cirurgia que não a adrenalectomia, a castração, 7 dias antes. O aumento da resposta vasoconstritora para o agonista do receptor B₁ também foi observado nas preparações de veia porta isolada de ratos ADX 7 dias antes do experimento. A contração induzida pelo agonista seletivo dos receptores B₁ des-Arg⁹-BK aumentou significativamente quando comparada com a mesma resposta obtida de preparações oriundas de animais FO. Tem sido descrito na literatura que há um aumento significativo dos níveis de citocinas e de PGE₂ plasmáticos decorrente da ausência total de corticóides circulantes (Mugridge et al., 1991;

Watanabe et al., 1995; Goujon et al., 1996; Yang et al., 1997; Nguyen et al., 2000). No presente trabalho verificou-se que há ausência total de corticosterona plasmática em ratos ADX 7 dias antes do teste, que é quando aparece o efeito máximo sobre a indução do receptor B₁. Entretanto, também foi observado que as alterações na resposta à des-Arg⁹-BK são revertidos 12 dias após a adrenalectomia. Há especulações a respeito da capacidade do organismo dos animais ADX de produzir corticóides por outros tecidos, como uma forma de adaptação. Entretanto, até o momento esse fenômeno ainda não foi comprovado cientificamente, mas poderia ser a explicação para reversão no aumento da resposta ao receptor B₁, 12 dias após a cirurgia, como observado neste trabalho.

Confirmando estudos anteriores utilizando ratos tratados com LPS, BCG ou citocinas pró-inflamatórias, ou após dessensibilização completa dos receptores B₂ *in vivo* (Campos e Calixto, 1995; Campos et al., 1996; 1997; 1998), o aumento no edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK em ratos ADX é um fenômeno mediado pela ativação do receptor B₁, mas não B₂, uma vez que o antagonista seletivo dos receptores B₁ a des-Arg⁹-NPC 17731, mas não o antagonista seletivo dos receptores B₂ o HOE 140, inibiu quase que completamente a formação do edema induzido pela des-Arg⁹-BK.

Em alguns casos, a ativação de receptores B₂ e da sua via de transdução, pode ser responsável pelo aumento da população dos receptores B₁, sugerindo assim a ocorrência de um balanço entre as duas populações de receptores (Marceau et al., 1998; Calixto et al., 2000). Tal fenômeno tem como reforço o fato dos genes para os dois receptores das cininas estarem localizados na mesma região do cromossomo, sugerindo uma regulação coordenada da

expressão dos mesmos (Bachvarov et al., 1998; Chai et al., 1996; Ma et al., 1994a). Como observado nos resultados obtidos com o tratamento sistêmico agudo dos animais com LPS, caso em que o aumento da resposta ao receptor B_1 está associado com a redução das respostas ao receptor B_2 (Cabrini et al., 1996; Campos et al., 1996). Contudo, muitas vezes a regulação da expressão dos genes é particular de cada um destes receptores (Hall, 1997; Marceau et al., 1998). Marceau e colaboradores (1999) confirmaram essa hipótese utilizando coelhos tratados com LPS, que apresentaram aumento no RNAm para o receptor B_1 , mas a expressão do receptor B_2 não se mostrou alterada. Além disso, os autores também demonstraram que o bloqueio sistêmico permanente dos receptores B_2 pelo HOE 140 ou pelo tratamento com diclofenaco (inibidor da COX) causou redução na expressão do RNAm do receptor B_2 , mas esse fenômeno não induziu mecanismo compensatório envolvendo o aumento da expressão do receptor B_1 (Marceau et al., 1999). A ausência do envolvimento dos receptores B_2 sobre as respostas da des-Arg⁹-BK foi também observada em camundongos nocaute para o receptor B_2 . McLean e colaboradores (2000) demonstraram que a IL-1 β induz a expressão de receptores B_1 de maneira independente da expressão de receptores B_2 , ou seja, os camundongos nocaute para o receptor B_2 responderam à IL-1 β da mesma forma que os animais não manipulados geneticamente. Sendo assim, o aumento da expressão do receptor B_1 em animais ADX parece ser um fenômeno específico, uma vez que a resposta induzida pelo agonista do receptor B_2 , tirosina⁸-BK, não diferiu entre os animais FO e ADX.

O mitotano é uma droga adrenocorticolítica comercializada como Lisodren®, utilizada na clínica para o tratamento de carcinoma adrenocortical e da

Síndrome de Cushing (Cai et al., 1995). Essa droga apresenta uma alta afinidade pelas células adrenais, alta toxicidade e causa inibição da produção dos hormônios da adrenocorticais (Schulick e Brennan, 1977; Moore et al., 1980; Cai et al., 1995). Com base nesses conhecimentos e visando obter informações adicionais sobre a hipótese de que a supressão dos hormônios adrenais resulta no aumento da resposta ao receptor B₁, ratos tratados durante 10 dias com mitotano, da mesma forma que foi observado nos animais ADX, apresentaram aumento importante da resposta edematogênica, bem como da contração da veia porta induzida pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK. Tais resultados confirmam e fornecem evidências adicionais sobre o papel exercido pelos glicocorticóides endógenos na regulação da expressão dos receptores B₁ para as cininas

Com o objetivo de verificar se o aumento na resposta para o receptor B₁ em ratos ADX está correlacionado diretamente ao aumento na expressão desses receptores, foi utilizada a técnica de RPA e o RNA codificador para o receptor B₁ das cininas nos tecidos pulmonares de ratos FO e ADX. Essa técnica possibilita verificar quantitativamente o aumento do RNAm específico do receptor B₁ de rato (Pesquero et al., 2000). Baseada na ligação específica entre o RNAm e o DNA, esta técnica representa com grande fidelidade, o perfil da expressão gênica, além de possibilitar a quantificação do RNA codificador específico com alta confiabilidade. Esses experimentos revelaram que o receptor B₁ foi expresso no pulmão de ratos ADX 5, 6 e 7 dias após a cirurgia, enquanto o pulmão de animais FO não apresentou qualquer indicação de RNA para o receptor B₁. A presença do RNA codificador para o receptor B₁ no quinto dia após a adrenalectomia não implica necessariamente na presença da proteína, uma vez que, funcionalmente, a resposta ao receptor B₁ (edema de pata) não se

mostrou aumentada, como observado no sétimo dia após a adrenalectomia. Entretanto, os animais FO, assim como os animais ADX, no primeiro até o terceiro dia após a operação, não mostraram qualquer sinal da presença do RNAm para o receptor B₁, o que confirma resultados descritos na literatura indicando a ausência completa do receptor no tecido pulmonar em condições normais. Como controle do ensaio foi utilizada a β -actina que se mostrou constantemente presente em todas as amostras, confirmando que a quantidade de RNA utilizada de cada amostra foi uniforme. Dessa forma, os resultados obtidos com a técnica de RPA para o receptor B₁ corroboram com os resultados funcionais, reforçando a hipótese de que a ausência dos glicocorticóides endógenos possibilita o aumento da expressão do receptor B₁, sem que seja necessária a presença de outro indutor, como um processo inflamatório, tratamento com LPS ou citocinas pró-inflamatórias.

Os glicocorticóides exógenos são drogas amplamente utilizadas para a supressão de doenças crônicas tais como a asma, artrite reumatóide, doenças autoimunes, doença inflamatória intestinal e patologias normalmente associadas com o aumento da expressão de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias (Barnes e Adcock, 1993; Barnes, 1998). A administração de glicocorticóides modula os mecanismos naturais de defesa que seguem um dano inflamatório, prevenindo assim mudanças marcantes na homeostase (Munck et al., 1984). A reação inflamatória severa e letal causada pelo tratamento dos animais ADX com LPS pode ser revertida completamente pela administração do glicocorticóide sintético dexametasona (Bertini et al., 1988; Flower et al., 1986). Confirmando e estendendo observações prévias (Campos et al., 1996; 1997), a reposição hormonal dos ratos ADX com dexametasona,

por 6 dias consecutivos, reduziu de maneira importante o aumento da resposta causado pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, tanto quando avaliado no edema de pata, como na contração da veia porta *in vitro*. Tais resultados sustentam o conceito que propõe a participação de síntese *de novo* do receptor B₁ após a retirada cirúrgica das glândulas adrenais. Provavelmente esse fato é decorrente do aumento da síntese de citocinas, PGs e outros mediadores que poderiam estar envolvidos na expressão dos receptores B₁ (DeBlois et al., 1988; Galkizzi et al., 1994; Levesque et al., 1995; para revisão ver: Marceau, 1998).

As endotoxinas são constituintes do LPS da porção mais externa da membrana de bactérias gram-negativas que são liberadas em decorrência da lise bacteriana. A administração de preparações purificadas de LPS mimetiza muitas das reações de fase aguda observada nas infecções por agentes gram-negativos sem infectar o hospedeiro ativamente (Burrell, 1994). Conseqüentemente, o tratamento de animais de laboratório com endotoxinas bacterianas tem sido um modelo bastante interessante e muito utilizado no estudo dos mecanismos envolvidos nas respostas neuroendócrinas decorrentes de infecções bacterianas e sepse (Dunn e Chuluyan, 1994; Tilders et al., 1994; Turbull e Rivier, 1995). Esse modelo de inflamação sistêmica tem sido amplamente aplicado no estudo do receptor B₁, pois causa sua expressão em diferentes tecidos. Assim, a indução do receptor B₁ causada por lesão tecidual pode explicar muitas observações *in vivo* sobre o aumento das respostas funcionais em sistemas relacionados à hemodinâmica, contração da musculatura lisa, percepção da dor e recrutamento de leucócitos (Davis e Perkins, 1994; Marceau, 1995; Ahluwalia e Perretti, 1996).

Existem relatos indicando que o LPS é capaz de estimular a resposta à des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelho, efeito que é inibido pela dexametasona (DeBlois et al., 1988; 1989). Ni e colaboradores (1998) mostraram que a presença da dexametasona reduz os níveis do RNA do receptor B₁ em células da musculatura lisa vascular de rato não estimuladas e suprime o aumento da sua expressão após tratamento dos animais com LPS. Os mesmos autores também mostraram que a dexametasona inibe a indução do receptor B₁, pelo menos em parte, atuando na transcrição do gene desse receptor (Ni et al., 1998). Sabe-se que produtos bacterianos sensibilizam o sistema cardiovascular de coelhos, ratos ou porcos ao agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK (Bouthilier et al., 1987; Tokumasu et al., 1995; Siebeck et al., 1989). A capacidade máxima de ligação (B_{máx}) da população de receptores B₁ é aumentada em células da musculatura vascular de coelhos após o tratamento com LPS (Galizzi et al., 1994). Além disso, a transcrição do gene do receptor B₁ foi demonstrada em coração de coelhos pré-tratados com endotoxina, mas não em órgãos de animais controle (Marceau et al., 1997).

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento dos coelhos com LPS (*in vivo*, 12 h antes) foi capaz de induzir um aumento expressivo da resposta à des-Arg⁹-BK na aorta isolada desses animais, logo na primeira hora após a montagem da preparação. Também foi verificado que o tratamento dos animais com dexametasona reverteu o aumento da resposta ao agonista do receptor B₁, na aorta de coelhos tratados com LPS. Tais resultados corroboram a sugestão de que os corticóides endógenos desempenham um papel importante na regulação da expressão do receptor B₁, mesmo quando a indução do receptor já foi desencadeada por um agente inflamatório como o LPS. Para

avaliar a seletividade de ação sobre o receptor B_1 , também foi feita a avaliação da resposta contrátil induzida pela NA mediante os mesmos tratamentos.

Os glicocorticóides ainda podem atuar, eles atuam ainda como imunossuppressores porque inibem, em parte, a transcrição gênica de citocinas e de moléculas de adesão. Tem sido descrito que os glicocorticóides fazem a regulação negativa da expressão de muitas proteínas envolvidas no processo inflamatório, como citocinas, por agirem diretamente em regiões específicas nos genes que são para a sua ligação, os chamados elementos de resposta aos glicocorticóides, ou ainda de maneira indireta sobre outros fatores de transcrição. Os fatores de transcrição apontados como os principais alvos de ação dos glicocorticóides são o elemento de resposta ao AMPc (CREB), e a expressão do RNAm do receptor R1 para o peptídeo intestinal vasoativo (Malkoski et al., 1997). Os glicocorticóides são capazes de reprimir a síntese do próprio hormônio tanto de maneira transcricional quanto pós-translacional (Oakley e Cidiowski, 1993; Webster e Cidloski, 1999). Com o intuito de explicar a supressão de genes pro-inflamatórios pelos esteróides, estudos recentes têm enfatizado a importância da interação entre os domínios do receptor de glicocorticóides com outros fatores de transcrição, tais como o NF- κ B, AP-1, CREB, OTF-1 e STAT5 (De Bosscher et al., 1997). Com base nesse mecanismo de ação dos corticóides, a inibição do fator de transcrição NF- κ B é de grande interesse, pois esse fator é um regulador de diversos genes de citocinas e outros agentes inflamatórios (Scheinman et al., 1995; Caldenhoven et al., 1995).

Há hoje evidências consideráveis indicando que o NF- κ B governa a expressão de genes codificadores de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e algumas proteínas de fase aguda

em processos fisiológicos e em diversos estados patológicos (Bauerle e Baltimore, 1996; Barnes e Karin, 1997; Barnes e Adcock, 1997). Além disso, evidências recentes sugerem que o NF- κ B exerce um papel importante na regulação da expressão do receptor B₁, *in vitro* (Schanstra et al., 1998; Ni et al., 1998) e *in vivo* (Campos et al., 1999). Existem ainda diversos relatos a respeito do envolvimento do NF- κ B em diferentes patologias, como artrite reumatóide, hiperplasia, choque séptico, respostas autoimunes, doenças cardiovasculares, entre outras (para revisão ver Makarov, 2000). Já doenças como psoríase e patologias neurodegenerativas parecem requerer ativação, e não supressão, do NF- κ B, para que ocorra melhora no quadro patológico (Schimidt et al., 1996; Mattson et al., 2000).

Para acomodar as mudanças do microambiente, as células ajustam seu padrão da expressão gênica. Esta regulação adaptativa ocorre primeiramente através de mecanismos transcricionais e é controlada pelos fatores de transcrição, os quais transmitem os sinais da membrana plasmática ou do próprio citoplasma, para o núcleo. No núcleo, os fatores de transcrição se ligam seletivamente aos seus sítios de reconhecimento nos elementos regulatórios presentes nos genes alvo, ativando ou reprimindo a transcrição. Assim, o fator de transcrição NF- κ B desempenha um papel importante e particular na regulação das respostas adaptativas a patógenos e ao estresse (para revisão ver Makarov, 2000). NF- κ B é o nome coletivo para fatores de transcrição diméricos que são membros da família Rel, proteínas que se ligam ao DNA e reconhecem uma seqüência em comum (5'GGG(A/G)NN(T/C)(T/C)CC3'). São cinco os membros conhecidos dessa

família: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52) (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Qualquer homo ou heterodímero é considerado NF- κ B, apesar do mais comumente encontrado em células ativadas ser o heterodímero RelA/NF- κ B1 (p65/p50).

Normalmente, o NF- κ B é encontrado no citoplasma na forma inativa acoplado à proteína inibitória I κ B. A ligação com o fator inibitório I κ B causa a retenção do NF- κ B no citoplasma, porque este encobre o sítio de localização do núcleo no NF- κ B (Makarov, 2000). Após a estimulação da célula por agentes inflamatórios como por exemplo citocinas (IL-1 β e TNF α), a proteína I κ B sofre fosforilação, ubiquitinação e degradação por proteasoma, liberando o NF- κ B que pode entrar para o núcleo da célula. A degradação do I κ B é controlada por três complexos protéicos: I κ B quinase (IKK), I κ B ligase da ubiquitina e 26S proteasoma (Karin e Bem Neriah, 2000; Israel, 2000). A atividade da IKK pode também ser induzida após certos estímulos como: mitógenos, proteínas virais, produtos bacterianos, fatores de crescimento, radiação, isquemia/reperfusão e estresse oxidativo, que fosforilam dois resíduos de serina do I κ B, tornando-o alvo para ubiquitinação e posterior degradação por proteasoma. A ativação do NF- κ B não exige síntese protéica *de novo* e ocorre minutos após a estimulação, modulando rapidamente a expressão de diversos mediadores da resposta inflamatória e imune. Até o momento mais de 150 genes responsivos ao NF- κ B já foram identificados, dentre eles, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento (Pahl, 1999). O envolvimento do NF- κ B em diferentes patologias inflamatórias torna esse fator de transcrição um alvo atraente para intervenção

terapêutica. Várias drogas antiinflamatórias, incluindo os antioxidantes, glicocorticóides, anitinflamatórios não esteroidais, imunossupressores e compostos de plantas, atuam como inibidores da via do NF- κ B, sugerindo que a supressão específica deste fator é um componente fundamental na descoberta de novas drogas antiinflamatórias (Eipinat e Gilmore, 1999; Makarov, 2000).

Sabe-se também que o gene do receptor B₁ humano apresenta na região 5', junto ao consenso TATA box, muitos sítios potenciais para ligação de fatores de transcrição, incluindo o Sp1, AP-1, NF- κ B e CREB (Ni et al., 1998). Schanstra e colaboradores (1998) descreveram que a expressão do receptor B₁ para as cininas em cultura de fibroblastos de pulmão humano, em resposta ao tratamento com IL-1 β , é modulada transcricionalmente através da ativação da via do NF- κ B. Reforçando essa hipótese, Larrivée e colaboradores (1998) mostraram que potenciais ativadores da via do NF- κ B (Schreck et al., 1992) como a tirosina-quinase e p38 proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), desempenham papel fundamental no processo de regulação da expressão do receptor B₁ pela ação de citocinas no modelo da aorta isolada de coelho. Campos e colaboradores (1999) mostraram que o NF- κ B parece estar amplamente envolvido no processo de indução do receptor B₁, quando a indução é feita pela injeção local das citocinas IL-1 β ou TNF α *in vivo*. Mecanismo semelhante parece envolver a indução do receptor B₁ causada pela adrenalectomia. Essa observação está baseada no fato de que o tratamento com uma droga conhecida por inibir a ativação do NF- κ B, PDTC preveniu marcadamente o aumento das respostas mediadas pelo agonista seletivo dos

receptores B₁, des-Arg⁹-BK, em ratos ADX, tanto quando avaliado no edema de pata, quanto na contração da veia porta. Além disso, foi possível confirmar a ativação desse fator de transcrição nos tecidos pela técnica de deslocamento da ligação em gel. De maneira específica, esse ensaio possibilitou verificar a presença do dímero (NF-κB) no extrato nuclear obtido de pulmão, pata ou coração de animais ADX. Em todos os tecidos testados, a ausência de corticóides causou a ativação do fator de transcrição 7 dias após a adrenalectomia. O efeito tempo-resposta de ativação do NF-κB em ratos ADX é bastante semelhante ao aparecimento do RNA codificador para o receptor B₁ (observado 5 dias após a cirurgia, apresentando expressão máxima no sétimo dia após a cirurgia). Além disso, ocorreu inibição completa do NF-κB no extrato nuclear de pulmão de ratos ADX tratados com dexametasona ou com PDTC. Tais resultados sugerem portanto, que a regulação endógena dos receptores B₁ pelos glicocorticóides parece depender da ativação da via do NF-κB.

Nossos resultados também mostram que a indução do receptor B₁ é dependente do tempo em que a preparação de aorta de coelho permanece incubada, processo que parece ser mediado pela ativação do NF-κB. Na aorta isolada de coelho a indução do receptor B₁ ocorre em decorrência do tempo de incubação das preparações, como descrito por diversos autores (Marceau, 1995; Marceau e Bachvarov, 1998). A presença constante (durante 6 h) de drogas conhecidas por inibirem o NF-κB, como PDTC, TLCK ou sulfasalazina (Schini-Kerth et al., 1997; Schreck et al., 1992; Wahl et al., 1998) diretamente nas preparações de aorta de coelho, causou inibição bastante intensa sobre o aumento da contração induzida pela des-Arg⁹-BK. Além disso, também foi

observado que somente a sulfasalazina foi capaz de causar alteração significativa sobre a contração induzida pela NA nesta preparação. Estes resultados sugerem que o efeito dos inibidores, neste caso, parece ser específico sobre o NF- κ B uma vez que a contração induzida pela NA não envolve a ativação da via deste fator de transcrição. Quando o processo inflamatório é provocado pela injeção de LPS, o mecanismo também parece envolver a ativação do mesmo fator de transcrição NF- κ B. Em coelhos que receberam LPS por via endovenosa e, em seguida foram tratados com o inibidor do NF- κ B, PDTC, houve redução significativa do aumento das respostas mediadas pelo agonista B₁, des-Arg⁹-BK, quando os experimentos foram realizados 12 h após o tratamento na aorta isolada desses animais. Contudo, o tratamento conjunto com PDTC também causou redução bastante significativa da contração à NA na aorta de coelho. Isso sugere que este inibidor (PDTC), administrado sistemicamente, pode estar atuando em outros sítios, que não a via do NF- κ B.

Existem na literatura muitas discussões a respeito da ação dos inibidores do NF- κ B, pelo fato dessas drogas não atuarem direta e seletivamente sobre o fator. Diferente dos glicocorticóides, existem evidências indicando que o PDTC suprime reversivelmente a liberação da subunidade do I κ B da forma citoplasmática latente do NF- κ B, bloqueando assim a ativação do NF- κ B antes da sua estimulação, sem alterar a atividade de ligação deste fator de transcrição ao DNA (Schreck et al., 1992). Entretanto, o modo de ação do PDTC ainda não está totalmente esclarecido. Acredita-se que através do seqüestro de espécies reativas de intermediários do oxigênio, o PDTC é capaz de inibir o NF- κ B em

vários tipos celulares (Schreck et al., 1992). Pinkus e colaboradores (1996) sugeriram que os efeitos inibitórios dos ditiocarbamatos como o PDTC, sobre a ativação do NF- κ B, estão mais relacionados à sua propriedade quelante de metais e seu efeito como antioxidante está relacionado ao grupamento tiol. Porém, são muitas as evidências a respeito da capacidade do PDTC em causar inibição da ativação do NF- κ B em resposta a diferentes estímulos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o tratamento crônico com PDTC foi capaz de causar inibição do NF- κ B, e não apresentou qualquer ação sobre AP-1, CREB, Sp-1, ou c-Jun (Schreck et al., 1992; Liu et al., 1999; Muller et al., 2000).

A sulfasalazina é uma droga utilizada na clínica para o tratamento da artrite reumatóide, uma doença onde a ativação do NF- κ B parece ser de grande importância tanto no início quanto na manutenção do processo inflamatório crônico (Miagkov et al., 1998; Bondeson, et al., 1999). Até pouco tempo acreditava-se que a sulfasalazina teria como principal mecanismo de ação antiinflamatória a capacidade de inibir a ciclooxigenase e a prostaglandina sintase (Kopp e Ghosh, 1994). Mais recentemente, Wahl e colaboradores (1998) demonstraram que a sulfasalazina inibe a ativação do NF- κ B pela ativação de células epiteliais. Complementando tais resultados, Weber e colaboradores (2000) sugeriram que parte da ação antiinflamatória *in vivo* da sulfasalazina é decorrente da sua inibição direta do complexo IKK, um regulador fundamental da ativação do NF- κ B, sem contudo afetar a ativação das proteínas quinases Erk1/2, JNK1 ou da p38 MAPK induzida pelo TNF- α . Já o TLCK é capaz de inibir a ativação do NF- κ B por inibir protease de serina, impedindo assim a degradação do I κ B e, conseqüentemente, a migração do fator de transcrição

NF- κ B para o núcleo da célula (Griscavage et al., 1996; Xie et al., 1994; Schini-Kerth et al., 1997). Entretanto, essas drogas convencionais inibem o NF- κ B de modo não específico, afetando também outros sinais de transdução. Trabalhos recentes têm utilizado oligodeoxinucleotídeos (ODN) de dupla-fita contendo sítio para ligação do NF- κ B, que atuam como uma armadilha para o fator de transcrição, impedindo de maneira específica sua atuação no DNA da célula (Makarov, 2000). Já foi demonstrado que a injeção intra-articular do ODN previne o desenvolvimento da artrite induzida pelo tratamento com adjuvante (Miagkov et al., 1998). No mesmo modelo o ODN também é capaz de inibir a produção de IL-1 β e TNF α (Tomita et al., 1999). Ainda, utilizando o tratamento com ODN, foi demonstrado o envolvimento do NF- κ B na colite intestinal (Neurath et al., 1996) e no infarto do miocárdio, reduzindo a extensão da lesão causada pela isquemia/reperfusão (Morishita et al., 1997).

De grande interesse no presente estudo são os resultados mostrando que o tratamento *in vivo* dos animais com doses sublimiares de dexametasona e PDTC, que isoladamente não tiveram qualquer efeito inibitório sobre a resposta do receptor B₁, causou uma marcante inibição do aumento da contração mediada pela des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelhos tratados com LPS, bem como na indução do receptor causada pela ausência de corticóides endógenos (adrenalectomia) em ratos. O ensaio de deslocamento da ligação em gel confirmou que a ativação do NF- κ B causada pela adrenalectomia foi completamente inibida pelo tratamento associativo de dexametasona e PDTC. Efeito sinérgico antiinflamatório semelhante com a associação do inibidor do NF- κ B com a dexametasona foi também observado *in vivo* por Fröde-Saleh e

Calixto (2000) no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. O fato de que baixas doses de dexametasona e PDTC, quando administradas conjuntamente, produzam uma grande inibição da indução do receptor B_1 , e do processo inflamatório (Fröde-Saleh e Calixto, 2000), pode ser de grande interesse e sugere que as duas drogas atuam em pontos diferentes, na via de expressão do receptor B_1 . Isso porque, não só o PDTC inibe o NF- κ B, mas a dexametasona também é capaz de inibir esse fator de transcrição, dentre outras várias ações antiinflamatórias.

Existem várias evidências recentes e consistentes demonstrando a interação direta entre o NF- κ B e o complexo glicocorticóide-receptor, sugerindo um antagonismo mútuo entre ambos. A ligação do complexo hormônio-receptor com o dímero NF- κ B inibe a ligação do fator de transcrição aos elementos do DNA (Webster e Cidloswki, 1999; Newton, 2000). Há ainda trabalhos relatando um mecanismo alternativo envolvendo o efeito repressor dos corticóides sobre o NF- κ B, que envolve o aumento na expressão do inibidor citoplasmático $I\kappa B\alpha$, prevenindo dessa forma a translocação do fator de transcrição para o núcleo da célula e conseqüentemente sua ligação com o DNA, através da retenção do dímero no citoplasma (Scheinman et al., 1995; Auphan et al., 1995). Entretanto, tal mecanismo permanece bastante controverso e parece depender muito do tipo de célula e estímulo envolvido (Newton, 2000). Alternativamente, pode-se explicar a grande inibição sobre o aumento na expressão do receptor B_1 , obtido com a combinação de doses sublimiares das duas drogas (dexametasona e PDTC), pelo fato delas atuarem em etapas distintas no mecanismo de indução do receptor B_1 . Com base nos conhecimentos atuais é possível sugerir que

ambas as drogas parecem inibir a via da ativação do NF- κ B, em diferentes sítios, tendo-se como resultado final efeitos somatórios sobre o mesmo fator transcricional, ou seja, sinergismo. A associação de baixas doses do corticosteróide com o inibidor do NF- κ B pode representar, portanto, uma importante estratégia terapêutica, aumentando a eficácia e a seletividade de ação e reduzindo os efeitos colaterais das drogas usadas para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, como a asma. Estudos adicionais são ainda necessários para o melhor entendimento do mecanismo preciso pelo qual essas duas drogas podem atuar de maneira sinérgica. É possível sugerir que a ausência de corticóides endógenos causa a expressão do receptor B₁ em diversos tecidos, envolvendo a ativação NF- κ B. Essa mesma via transcricional parece também estar envolvida na indução do receptor B₁ causado pelo tratamento com LPS ou com citocinas (Ni et al., 1998; Campos et al., 1999).

Há diversos relatos na literatura sugerindo que parte dos efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides envolve inibição da síntese de prostanóides, talvez pela regulação da indução da COX causada por citocinas (Gryglewski et al., 1975; Russo-Marie, 1990). O aumento do metabolismo do ácido araquidônico geralmente acompanha o processo inflamatório e a lesão tecidual. As PGs são substâncias que atuam como hormônios locais e, dessa forma, são importantes na fisiologia e também em condições patológicas (Vane e Botting, 1994). A produção de PGs é iniciada pela ativação da fosfolipase A₂, que libera ácido araquidônico a partir do metabolismo dos fosfolípidios da membrana celular. Esse último é substrato para a enzima COX, resultando na síntese de PGs e de tromboxano A₂. As PGs protegem a mucosa gástrica e influenciam a função renal, entre outros efeitos, enquanto

que o tromboxano A_2 estimula a formação de trombos, promovendo a agregação plaquetária. As PGs também são responsáveis pelos sinais e sintomas da inflamação aguda e crônica e na dor (Portanova et al., 1996).

Por anos pensou-se que a COX era uma única enzima presente constitutivamente em todas as células. Recentemente, foram identificadas duas isoenzimas distintas (Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1992; Xie et al., 1991): a constitutiva (COX-1), presente na maioria dos tecidos, necessária para o funcionamento fisiológico e outra na forma induzível (COX-2), cuja expressão está associada com processos inflamatórios (Fu et al., 1990; Masferrer et al., 1992; 1994; Seibert et al., 1994; Anderson et al., 1996; Talley, 1999). A COX-2 está bastante aumentada em sítios inflamatórios tais como na artrite reumatóide e na inflamação induzida pela carragenina (Nantel et al., 1999; Geng et al., 1995). Além disso, a COX-2 é a isoforma induzida em células transformadas e em tecido tumoral (Subbaramaiah et al., 1996; Kutchera et al., 1996; Sheng et al., 1997; Parett et al., 1997). Sendo assim, a exemplo do receptor B_1 , a COX-2 encontra-se normalmente ausente em condições normais na maioria dos tecidos, mas pode ser induzida pelos mesmos estímulos inflamatórios, como o LPS, carragenina, adjuvante, ou algumas citocinas em muitas células e tecidos (Vane et al., 1998; Willoughby et al., 2000). O gene da COX-2 em camundongos, ratos e humanos já foi clonado e sequenciado (Fletcher et al., 1992; Sirois et al., 1993; Kosaka et al., 1994). A região promotora do gene para a COX-2, do mesmo modo que a do receptor B_1 , apresenta um elemento TATAbox e vários sítios regulatórios transcricionais tais como CREB, AP2, Sp1, NF-IL6 e também o NF- κ B (Yamamoto et al., 1995).

Quanto ao mecanismo de indução da enzima COX-2, existem diversas semelhanças com os mecanismos que regulam a expressão do receptor B₁. D'Aquisto e colaboradores (1997) demonstraram que inibidores do NF-κB, como PDTC e o TLCK, foram capazes de inibir a expressão da COX-2 em macrófagos ativados por LPS. Como o receptor B₁, a indução da enzima COX-2 e de outra enzima induzível, a óxido nítrico sintase (iNOS), envolve a ativação da p38 MAPK, do NF-κB e do AP-1, em macrófagos estimulados com LPS (Chen et al., 1999). A ativação de tirosinas quinases tipo JAK também parece fazer parte do mecanismo que induz a expressão do gene da COX-2 (Ruetten e Thiemermann, 1997), bem como para a iNOS (Cruz et al., 1999). Além disso, a expressão da COX-2 é sensível à ação de corticóides e de inibidores da síntese protéica (Honda et al., 2000). Geng e colaboradores (1995) descreveram que a produção de grandes quantidades de PGE₂, através da ativação de condrócitos pela IL-1 está associada com a expressão de COX-2, através de um mecanismo sensível à dexametasona e dependente da ativação da via da tirosina quinase. Complementando, Masferrer e colaboradores (1992; 1994) demonstraram que macrófagos peritoneais obtidos de camundongos ADX apresentam aumento do RNAm e da proteína para a COX-2, o que não ocorre com animais FO. Os autores demonstraram ainda que a expressão da COX-2 foi inibida pela dexametasona. Tais resultados levaram os autores a sugerirem que, sob condições normais, os glicocorticóides endógenos possuem ação inibitória sobre a expressão da COX induzida. Assim, a redução dos corticóides deve causar uma exacerbação da resposta inflamatória relacionada ao aumento da expressão da COX-2, bem como da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Bertini et al., 1988; Kujubu e

Herschman, 1992; Masferrer et al., 1992; 1994; Goppelt-Struebe, 1997). Baseando-se nesses e outros trabalhos descritos na literatura, pode-se observar que muitos dos mecanismos que regulam a expressão dos receptores B₁, parecem também regular a expressão da COX-2. Além disso, produtos derivados da COX-2 capazes de mediar processos inflamatórios crônicos, tratamento com LPS, citocinas pró-inflamatórias ou com ésteres de forbol (Akaraserenont et al., 1995; Crofford et al., 1994), também poderiam estar associados a indução do receptor B₁. Complementando estudos anteriores realizados por Campos e colaboradores (1997; 1998), os resultados do presente estudo sugerem que os metabólitos derivados da COX-2 e, em menor extensão, aqueles derivados da COX-1, parecem contribuir de maneira significativa para o controle do edema de pata mediado pela des-Arg⁹-BK em ratos ADX. Para explorar melhor essa hipótese, foram utilizados inibidores seletivos da COX-2, DFU (Riendeau et al., 1997) e NS-398 (Futaki et al., 1994) que preveniram o aumento dependente do tempo da resposta contrátil mediada pela des-Arg⁹-BK na aorta de coelho *in vitro*, sem afetar a contração causada pela NA. A indometacina, um inibidor não seletivo da COX (Henry et al., 1993), causou inibição semelhante no aumento da resposta ao receptor B₁, mas um inibidor mais seletivo para a COX-1, piroxicam (Mitchell et al., 1995), não causou qualquer efeito. Vale ainda ressaltar que, quando os inibidores de COX são incubados somente por 30 min e somente após 6 h de incubação, ou seja, após a indução do receptor, não ocorre qualquer alteração na contração induzida pela des-Arg⁹-BK. Esses dados sugerem que na aorta isolada de coelho, a resposta contrátil induzida pela ativação dos receptores B₁ não envolve liberação de prostanóides. Em conjunto, esses resultados estão de

acordo com o conceito de que os produtos da COX-2, derivados da via do ácido araquidônico, possuem um importante papel sobre a regulação da expressão do receptor B₁ na aorta de coelho.

Existem ainda diversos trabalhos na literatura mostrando que a proteína quinase que fosforila o I κ B pode ser ativada por uma quinase indutora do NF- κ B (NIK), pela MAPK (Nakano et al., 1998), entre outras quinases. Os experimentos *ex vivo* do presente estudo usando o inibidor da tirosina quinase, a genisteína, confirmam e também ampliam os resultados recentes relatados por Larrivé e colaboradores (1998), os quais demonstraram que a indução do receptor B₁ pelo tratamento com IL-1 β na aorta de coelho envolve a ativação da via de tirosina quinase. A família da JAK (*janus quinase*) é composta por proteínas tirosina quinase que participam da resposta posterior à ativação dos receptores para citocinas (Mori et al., 1993; Roche et al., 1995; Erpel e Courneidge, 1995). Além disso, tirosina quinases e p38 MAPK, podem ser ativadas por vários fatores do estresse (Kato et al., 1998), LPS (Ruetten e Thiemermann, 1997) ou mesmo por receptores acoplados à proteína G, como o receptor B₂ (Lal et al., 1998; Alric et al., 1999; Pan et al., 1998). Hawes e colaboradores (1995) demonstraram que a genisteína inibe a ativação da MAPK estimulada pelo complexo $\beta\gamma$ da proteína G, sugerindo assim a participação de proteínas tirosina quinase na ativação da via da MAPK. Além disso, em fibroblastos de pulmão de embrião humano, a IL-1 β induz a expressão do RNAm codificador do receptor B₁ através da ativação da tirosina quinase, sendo que esse efeito é antagonizado por inibidores do NF- κ B (Zhou et al., 1998).

Zhou e colaboradores (1998) também demonstraram, no modelo de fibroblastos de pulmão de embrião humano, que o éster de forbol (ativador irreversível da proteína quinase C) é capaz de induzir o receptor B₁ envolvendo a ativação do NF-κB. Nossos resultados obtidos nos experimentos realizados em aorta de coelho neste trabalho concordam com as observações descritas por Larrivé e colaboradores (1998) e Campos e colaboradores (1999) e sustentam a idéia de que a via da proteína quinase C parece desempenhar um papel fundamental na regulação da expressão do receptor B₁ para as cininas na aorta de coelho. Essa observação está baseada em dados que mostram que tanto a estaurosporina, quanto RO318220 foram capazes de inibir o aumento dependente do tempo da resposta à des-Arg⁹-BK na aorta de coelho *in vitro*. Todos esses efeitos parecem apresentar certa especificidade, uma vez que nas mesmas concentrações em que os inibidores das quinases reduziram o aumento dependente do tempo da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na aorta de coelho, não causaram qualquer ação significativa sobre a contração induzida pela NA na mesma preparação. Entretanto, ao contrário do que foi descrito por Levesque et al. (1993), todos os inibidores da proteína quinase C, testados em concentrações semelhantes, falharam em afetar a contração induzida pela des-Arg⁹-BK quando os experimentos foram realizados 6 h após a montagem das preparações (ou seja, quando o receptor B₁ já havia sido expresso). Tais resultados sugerem o envolvimento da proteína quinase C no processo de indução da expressão do receptor B₁ na aorta de coelho, mas não na contração direta mediada pelo agonista B₁ quando o receptor já foi induzido. As discrepâncias observadas entre os resultados do presente estudo e aqueles descritos por Levesque e

colaboradores (1993) poderiam ser atribuídas a diversos fatores metodológicos, além da falta de seletividade dos inibidores de quinases utilizados no trabalho mencionado. Com base nos resultados obtidos na aorta de coelho, utilizando diferentes inibidores de quinases, podemos sugerir que o mecanismo de indução do receptor B_1 envolve a ativação da via do fator de transcrição NF- κ B, provavelmente ativado por diferentes proteínas quinases.

Complementando esses resultados, alguns experimentos foram feitos na tentativa de avaliar se a associação de alguns inibidores utilizados, que foram eficazes em inibir a expressão do receptor B_1 na aorta isolada de coelho, teria efeito sinérgico, como aquele apresentado pelo tratamento *in vivo* com a dexametasona e o PDTC. Entretanto, os resultados mostraram que a combinação *in vitro* do DFU com TLCK, do DFU com indometacina ou ainda do TLCK com DFU e genisteína, não produziu supressão adicional sobre o aumento da contração dependente do tempo induzida pela des-Arg⁹-BK, além daquela causada quando as drogas foram testadas individualmente. Tais resultados sugerem que esses inibidores provavelmente estão agindo através de etapas semelhantes ao longo a via de expressão do receptor B_1 . É possível, portanto, sugerir que os metabólitos derivados da ação da COX-2, a via do fator de transcrição NF- κ B e tirosina quinase fazem parte de uma mesma via que participa do aumento na expressão do receptor B_1 .

Finalmente, procurou-se verificar o efeito da adrenalectomia sobre a resposta à estímulos inflamatórios mais complexos, como por exemplo o edema de pata induzido pela carragenina ou dextrana. A injeção intraplantar de carragenina em ratos é um modelo comum para o estudo de inflamação e hiperalgesia. Este agente flogístico causa edema e aumenta a sensibilidade à

estímulos térmicos e mecânicos (hiperalgesia), através da liberação de diversos mediadores inflamatórios (PGs, NO, cininas, serotonina, etc). Antiinflamatórios convencionais, inibidores da COX-2 e da PGE₂ são agentes antiinflamatórios efetivos nesse modelo (Chan et al., 1995; Rindeau et al., 1997; Zhang et al., 1997). Vários trabalhos têm mostrado o aumento na expressão da COX-2 associado com aumento na produção de prostanóides, no edema de pata induzido pela carragenina (Portanova et al., 1996; Zhang et al., 1997; Nantel et al., 1999). Nantel e colaboradores (1999) mostraram que múltiplos mecanismos parecem envolvidos na expressão da COX-2 nesse modelo inflamatório, e que a produção de prostanóides induzida pela injeção de carragenina faz um feedback positivo sobre a indução da COX-2. D'Aquisto e colaboradores (1999) demonstraram que a resposta inflamatória causada pela carragenina também envolve a indução da enzima iNOS, e que o NF- κ B participa desse mecanismo. Quanto às cininas, as patas injetadas com carragenina possuem quantidades aumentadas de BK e des-Arg⁹-BK (Burch e DeHaas, 1990). Já a resposta edematogênica da dextrana envolve a liberação de diversos mediadores, principalmente agentes vasoativos, como a histamina liberada de mastócitos (Papp et al., 1992). De acordo com esses dados, o aumento significativo do edema de pata induzido pela carragenina e também pela dextrana em animais ADX 7 dias antes, pode sugerir que, além da regulação da expressão do receptor B₁, os corticóides endógenos regulam as ações de outros mediadores envolvidos e na resposta inflamatória.

A indução do receptor B₁, da COX-2, da iNOS, e de outros receptores como o NK₁ para as taquicinas, o receptor A₁ para adenosina, alguns receptores para citocinas e fatores de crescimento, bem como para alguns

receptores órfãos (Donaldson et al., 1997) é uma resposta aguda que regula a sensibilidade do tecido, permitindo uma alteração rápida na fisiologia funcional da célula. Esse fenômeno parece ser regulado localmente, principalmente porque essas mudanças são rápidas, ocorrem em uma população definida de células por um período limitado e são desencadeadas como resposta a sinais externos específicos. Sendo assim, o controle da indução do receptor parece ser um alvo terapêutico importante para o tratamento de processos inflamatórios.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra, através de estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* e com o emprego de técnicas moleculares que os corticóides endógenos possuem papel crítico no controle da expressão do receptor B₁. Esta hipótese está baseada no fato de que a supressão dos hormônios adrenocorticais circulantes, tanto cirurgicamente (retirada das adrenais) quanto farmacologicamente (tratamento com mitotano), resultou em aumento marcante da contração da veia porta e da formação do edema de pata induzido pelo agonista B₁ des-Arg⁹-BK. Foi demonstrado ainda que a expressão do receptor B₁, induzida por diferentes métodos (LPS, longos períodos de incubação, ausência de corticóides endógenos) e em diferentes tecidos (aorta de coelho, edema de pata, veia porta, pulmão), envolve a ativação de uma via onde participam diferentes elementos como proteína quinase C, MAPK, JAK quinase, produtos da ação da COX-2, que convergem para a ativação da via do fator NF-κB.

Com base nessa coletânea de evidências obtidas no presente estudo junto ao que já encontra-se estabelecido por outros autores, podemos sugerir um mecanismo de regulação da expressão do receptor B₁ para as cininas. Como apresentado no esquema na figura 17, após estímulos inflamatórios, como os produzidos por citocinas, LPS, estresse oxidativo, mediadores inflamatórios como BK ou PGs, atuando através de seus próprios receptores ou diretamente sobre algum mecanismo intracelular, promovem a ativação de

proteínas quinases. Essas quinases, como por exemplo JAK, MAPK e PKC, são proteínas com alta capacidade de fosforilação e autoregulação que podem causar ativação entre si e também fosforilar a quinase do I κ B (IKK). Como consequência da degradação do I κ B, ocorre a liberação e ativação do NF- κ B. Este fator de transcrição ativado migra para o núcleo celular onde irá atuar em regiões específicas no DNA denominadas κ B, causando a estimulação de determinados genes. Quando grande quantidade desse fator de transcrição é estimulada, ocorre uma disfunção celular acarretando aumento exacerbado na síntese de proteínas pró-inflamatórias, tais como de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas (COX-2 e iNOS) e receptores como o receptor B₁ para as cininas. Além disso, pode-se também acrescentar que metabólitos resultantes da ação da COX-2 parecem participar fortemente na expressão do receptor B₁. Finalmente, os corticóides são capazes de regular a expressão desse receptor por mecanismos que envolvem a inibição do NF- κ B, tanto por interação direta com o fator quanto indiretamente, por indução do I κ B. Sendo assim, a ausência de corticóides endógenos (pela adrenalectomia) parece alterar o processo estável de regulação do receptor B₁, bem como de citocinas e prostanóides derivados da ação da COX-2.

A indução do receptor B₁, portanto, é um fenômeno que pode ocorrer nos diferentes tipos de inflamação de maneira não específica. Devido ao fato desse receptor encontrar-se envolvido na manutenção do processo inflamatório crônico e apresentar a característica de ser rapidamente induzido a partir de um estímulo nocivo, é de grande interesse a melhor compreensão dos mecanismos que regulam sua indução. Os resultados presentes

contribuem para uma melhor compreensão do processo de indução do receptor B₁, indicando o envolvimento importante da via do fator de transcrição NF-κB, bem como dos corticóides endógenos na sua modulação. Pode-se sugerir ainda que, independente do estímulo utilizado para indução do receptor B₁ (LPS, citocinas, incubação *in vitro*, ou ainda, a ausência dos corticóides endógenos), a ativação da via do fator NF-κB parece ser crítica na regulação da indução do receptor B₁ assim como de outros importantes mediadores inflamatórios.

Cada vez mais surgem trabalhos demonstrando que a via do NF-κB é um fator em comum entre muitos mediadores e é responsável pelo controle da expressão. Os mediadores, cada um a sua maneira, contribuem de maneira específica para a promoção e manutenção da patologia inflamatória, conferindo alta complexidade e de difícil compreensão à esse processo. Entretanto, substâncias capazes de inibir o NF-κB, até o momento, não parecem ser viáveis na clínica, uma vez que não apresentam ação específica sobre esse fator e, mesmo que o façam poderiam causar também interferência no controle das suas ações fisiológicas.

Existem ainda questões a serem esclarecidas no que concerne a função do receptor B₁, bem como dos mecanismos moleculares que controlam sua expressão. Uma melhor compreensão desse fenômeno poderia auxiliar no melhor entendimento do processo inflamatório e nociceptivo, e consequentemente propiciar o desenvolvimento de uma terapêutica mais eficiente, e certamente com menos efeitos secundários para o tratamento dos processos inflamatórios crônicos.

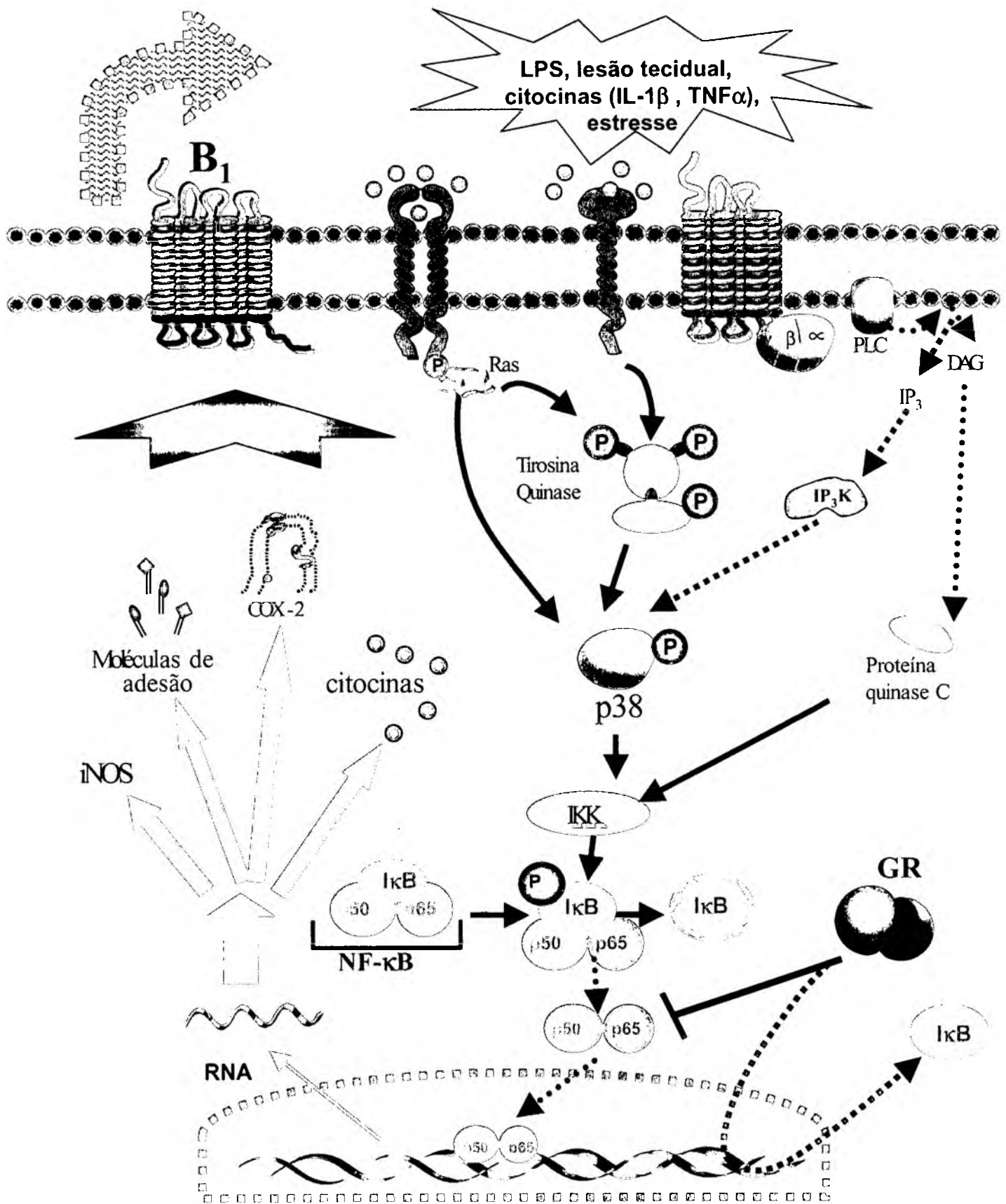


Figura 17 – Desenho esquemático que explica o mecanismo proposto para a regulação da indução do receptor B₁ para as cininas. IKK, proteína quinase do IκB; IκB, proteína inibitória do NF-κB; NF-κB, fator nuclear-κB; MAPK, quinase da proteína ativada por mitógeno; COX-2, ciclooxigenase-2; GR, glicocorticóide-receptor; IP₃, inositoltrifosfato; PLC, fosfolipase C; DAG diacilglicerol; IP₃K, proteína quinase ativada pelo IP₃; GR, complexo receptor-glicocorticóide; iNOS, óxido nítrico sintase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD ALLA, S.; QUITTERER, U.; SCHRODER, C.; BLAUKAT, A.; HORSTMAYER, A.; DEDIO, J.; REILANDER, H.; MULLER-ESTERL, W. On the structure of the amino-terminal domain ED1 of the B₂ receptor. **Immunopharmacol.**, 35, 23-26, 1996a.
- ABD ALLA, S.; QUITTERER, U.; SCHRODER, C.; BLAUKAT, A.; HORSTMAYER, A.; DEDIO, J.; REILANDER, H.; MULLER-ESTERL, W. (1996b) On the structure of the amino-terminal domain ED1 of the B₂ receptor. **Immunopharmacol.**, 33, 42-45, 1996b.
- AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. B₁ receptors as a new inflammatory target. Could this B be the 1? **Trends. Pharmacol. Sci.**, 20, 100-104, 1999.
- AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β *in vivo* in the mouse. **J. Immunol.**, 156, 269-278, 1996.
- AKARASEREENONT, P.; MITCHELL, J.A.; BAKHLE, Y.S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J.R. Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, 273, 121-128, 1995.
- ALFIE, M.E.; YANG, X.P.; HESS, F.; CARRETERO, O.A. Salt-sensitive hypertension in bradykinin B₂ receptor knockout mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224, 625-630, 1996.
- ALFIE, M.E.; YANG, X.P.; HESS, F.; CARRETERO, O.A. Salt-sensitive hypertension in bradykinin B₂ receptor knockout mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224, 625-630, 1996.
- ALRIC, C.; PECHER, C.; BASCANDS, J.L.; GIROLAMI, J.P. Effect of bradykinin on tyrosine kinase and phosphatase activities and cell proliferation in mesangial cells. **Immunopharmacol.**, 45, 57-62, 1999.
- ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MCGARITY, K.L.; BREMER, M.E.; ISAKSON, P.C.; GREGORY, S.A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **J. Clin. Invest.**, 97, 2672-2679, 1996.
- AUDET, R.; PETICLERC, E.; DRAPEAU, G.; RIOUX, F.; MARCEAU, F. Further analysis of the upregulation of bradykinin B₁ receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, 271, 551-555, 1994.
- AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappaB activity through induction of I kappaB synthesis. **Science**, 270, 286-290, 1995.

- AUSTIN, C.E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H.E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D.J.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Stable expression of the human kinin B₁ receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. **J. Biol. Chem.**, 272, 11420-11425, 1997.
- BABIUK, C.; MARCEAU, F.; ST-PIERRE, S.; REGOLI, D. Kininases and vascular responses to kinins. **Eur. J. Pharmacol.**, 78, 167-174, 1982.
- BACHVAROV, D.R.; HESS, J.F.; MENKE, J.G.; LARRIVEE, J.F.; MARCEAU, F. Structure and genomic organization of the human B₁ receptor gene for kinins (BDKRB1). **Genomics**, 33, 374-381, 1996.
- BACHVAROV, D.R.; LANDRY, M.; HOULE, S.; PARE, P.; MARCEAU, F. Altered frequency of a promoter polymorphic allele of the kinin B₁ receptor gene in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 115, 1045-1048, 1998.
- BACHVAROV, D.R.; SAINT-JACQUES, E.; LARRIVEE, J.F.; LEVESQUE, L.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B₂ receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 275, 1623-1630, 1995.
- BALDWIN, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, 14, 649-683, 1996.
- BARNES, P.J. Pathophysiology of asthma. In: BARNES, P.J.; ROGER, I.W.; THOMPSON, N.C., eds. **Asthma: Basic mechanisms and clinical management**. London: Academic Press, 487-506, 1998.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14, 436-441, 1993.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18, 46-50, 1997.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, 336, 1066-1071, 1997.
- BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 31, 129-162, 1991.
- BAUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-κB: ten years after. **Cell**, 87, 13-20, 1996.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. **Cell**, 56, 335-344, 1989.
- BERTINI, R.; BIANCHI, M.; GHEZZI, P. Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.**, 167, 1708-1712, 1988.
- BHOOLA, K.D. Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation. **Immunopharmacol.**, 33, 247-256, 1996.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44, 1-80, 1992.

- BLAIS, C.; DRAPEAU, G.; RAYMOND, P.; LAMONTAGNE, D.; GERVAIS, N.; VENNEMAN, I.; ADAM, A. Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. **Am. J. Physiol.**, 273, H2263-H2271, 1997.
- BLAIS, C.; MARCEAU, F.; ROULEAU, J.; ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. **Peptides**, 21, 1903-1940, 2000.
- BOCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 68, 587-592, 2000.
- BONDESON, J.; FOXWELL, B.; BRENNAN, F.; FELDMANN, M. Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96, 5668-5673, 1999.
- BORKOWSKI, J.A.; RANSOM, R.W.; SEABROOK, G.R.; TRUMBAUER, M.; CHEN, H.; HILL, R.G.; STRADER, C.D.; HESS, J.F. Targeted disruption of a B₂ bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **J. Biol. Chem.**, 270, 13706-13710, 1995.
- BOUMA, B.N.; KERBIRIOU, D.M.; VLOOSWIJK, R.A.; GRIFFIN, J.H. Immunological studies of prekallikrein, kallikrein, and high-molecular-weight kininogen in normal and deficient plasmas and in normal plasma after cold-dependent activation. **J. Lab. Clin. Med.**, 96, 693-709, 1980.
- BOUTHILIER, J.; DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacologic responses to des-Arg⁹-bradykinin *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, 92, 257-263, 1987.
- BRASIER, A.R.; LI, J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. **Hypertension**, 27, 465-475, 1996.
- BURCH, R.M.; DEHAAS, C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 342, 189-193, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J.; STORMENN, T.M. **Molecular biology and pharmacology of bradykinin receptors**. Ed. BURCH, R.M., pp. 107, Austin, R.G. Landes Co, 1993.
- CABRINI, D.A.; KYLE, D.J.; CALIXTO, J.B. A pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277, 299-307, 1996.
- CABRINI, D.C.; SILVA, A.M.; CALIXTO, J.B. Mechanisms of bradykinin-induced contraction of the guinea-pig gallbladder *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, 114, 1549-1556, 1995.
- CAI, W.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T.; SCHEINGART, D.E.; SINSHEIMER, J.E.; WOTRING, L.L. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. **J. Pharm. Sci.**, 84, 134-138, 1995.

- CALDENHOVEN, E.; LIDEN, J.; WISSINK, S.; VAN DE STOLPE, A.; RAAIJMAKERS, J.; KOENDERMAN, L.; OKRET, S.; GUSTAFSSON, J.A.; VAN DER SAAG, P.T. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. **Mol. Endocrinol.**, 9, 401-412, 1995.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins and pain and inflammation. **Pain**, 87, 1-5, 2000.
- CAMPBELL, W.; YONEZU, K.; SHINOHARA, T.; OKADA, H. An arginine carboxypeptidase generated during coagulation is diminished or absent in patients with rheumatoid arthritis. **J. Lab. Clin. Invest.**, 115, 610-612, 1990.
- CAMPOS, A.H.; 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.; CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, 114, 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M.; HENRIQUES, M.G.; CALIXTO, J.B. The role of B₁ and B₂ kinin receptors in oedema formation after long-term treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). **Br. J. Pharmacol.**, 120, 502-508, 1997.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. *In vivo* B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor- κ B pathways. **Br. J. Pharmacol.**, 127, 1851-1859, 1999.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Modulation of kinin B₁ but not B₂ receptor-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha. **Peptides**, 19, 1269-1276, 1998.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Up-regulation of B₁ mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 117, 793-798, 1996.
- CASSIM, B.; NAIDOO, S.; NAIDOO, Y.; WILLIAMS, R.; BHOOLA, K.D. Immunolocalisation of the kinin moiety and bradykinin (B₂) receptors on synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunopharmacol.**, 33, 321-324, 1996.
- CHAI, K.X.; NI, A.; WANG, D.; WARD, D.C.; CHAO, J.; CHAO, L. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomaml localization of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB1. **Genomics**, 31, 51-57, 1996.
- CHAN, C.C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; GORDON, R.; GUAY, D.; HILL, R.G.; LI, C.S.; MANCINI, J.; PENNETON, M. Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 274, 1531-1537, 1995.

- CHEN, C.; CHEN, Y.H.; LIN, W.W. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. **Immunol.**, 97, 124-129, 1999.
- COELHO, M.M.; OLIVEIRA, C.R.; PAJOLLA, G.P.; CALIXTO, J.B.; PELA, I.R. Central involvement of kinin B₁ and B₂ receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 121, 296-302, 1997.
- COUTURE, R.; LINDSEY, C.J. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quiron R, Björklund A, Hökfeld T, editors. Handbook of chemical neuroanatomy, vol. 16: Peptide receptors, part 1, Netherlands: Elsevier, pp. 241-300, 2000.
- CROFFORD, L.J.; WILDER, R.L.; RISTIMAKI, A.P.; SANO, H.; REMMERS, E.F.; EPPS, H.R.; HLA, T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.**, 93, 1095-1101, 1994.
- CRUZ, M.T.; DUARTE, C.B.; GONCALO, M.; CARVALHO, A.P.; LOPES, M.C. Involvement of JAK2 and MAPK on type II nitric oxide synthase expression in skin-derived dendritic cells. **Am. J. Physiol.**, 277, C1050-C1057, 1999.
- CUMMING, A.D.; WALSH, T.; WOJTACHA, D.; FLEMING, S.; THOMSON, D.; JENKINS, D.A. Expression of tissue kallikrein in human kidney. **Clin. Sci.**, 87, 5-11, 1994.
- CURRAN, T.; MORGAN, J.I. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. **J. Neurobiol.**, 26, 403-412, 1995.
- D'AQUISTO, F.; IUVONE, T.; ROMBOLÁ, L.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M.; CARNUCCIO, R. Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS Lett.**, 418, 175-178, 1997.
- DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 113, 63-70, 1994.
- DE BOSSCHER, K.; SCHMITZ, M.L.; VANDEN BERGHE, W.; PLAISANCE, S.; FIERS, W.; HAEGEMAN, G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94, 13504-13509, 1997.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, 93, 969-977, 1998.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulation responses to des-Arg⁹-bradykinin *in vivo* and *in vitro*. **Immunopharmacol.**, 17, 187-198, 1989.
- DEBLOIS, D.; BOUTILLIER, J.; MARCEAU, F. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg⁹-bradykinin: possible role of interleukin-1. **Br. J. Pharmacol.**, 103, 1057-1066, 1991.

- DECARIE, A.; RAYMOND, P.; GERVAIS, N.; COUTURE, R.; ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. **Am. J. Physiol.**, 271, H1340-H1347, 1996.
- DONALSON, L.F.; HANLEY, M.R.; VILLABLANCA, A.C. Inducible receptors. **TIPS**, 18, 171-181, 1997.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, 16, 99-104, 1993.
- DRUMMOND, G.R.; COCKS, T.M. Endothelium-dependent relaxation to the B₁ kinin receptor agonist des-Arg⁹-bradykinin in human coronary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, 116, 3083-3092, 1995.
- DUNN, A.J.; CHULUYAN, H.E. Endotoxin elicits normal tryptophan and indolamine responses but impaired catecholamine and pituitary-adrenal responses in endotoxin-resistant mice. **Life Sci.**, 54, 847-53, 1994.
- EL-DAHR, S.S.; FIGUEROA, C.D.; GONZALEZ, C.B.; MULLER-ESTERL, W. Ontogeny of bradykinin B₂ receptors in the rat kidney: implications for segmental nephron maturation. **Kidney Int.**, 51, 739-749, 1997.
- EMANUELI, C.; BONARIA SALIS, M.; CHAO, J.; CHAO, L.; CAPOGROSSI, M.C.; MADDEDU, P. Participation of kinins in the captopril-induced inhibition of intimal hyperplasia caused by interruption of carotid blood flow in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 131, 1076-1082, 2000.
- EMANUELI, C.; MAESTRI, R.; CORRADI, D.; MARCHIONE, R.; MINASI, A.; TOZZI, M.G.; SALIS, M.B.; STRAINO, S.; CAPOGROSSI, M.C.; OLIVETTI, G.; MADEDDU, P. Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. **Circulation**, 100, 2359-2365, 1999.
- EMANUELI, C.; MAESTRI, R.; CORRADI, D.; MARCHIONE, R.; MINASI, A.; TOZZI, M.G.; SALIS, M.B.; STRAINO, S.; CAPOGROSSI, M.C.; OLIVETTI, G.; MADEDDU, P. Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. **Circulation**, 100, 2359-2365, 1999.
- EPINAT, J.C.; GILMORE, T.D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. **Oncogene**, 18, 6896-909, 1999.
- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15, S20-S24, 1990.
- ERPEL, T.; COURTNEIDGE, S.A. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 7, 176-182, 1995.
- FARMER, S.G.; POWELL, S.J.; WILKINS, D.E.; GRAHAM, A. Cloning, sequencing and functional expression of a guinea pig lung bradykinin B₂ receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, 346, 291-298, 1998.
- FAUSSNER, A.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation. **Immunopharmacol.**, 45, 13-20, 1999.

- FAUSSNER, A.; PROUD, D.; TOWNS, M.; BATHON, J.M. Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B₁ and B₂ kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization and signal transduction. **J. Biol. Chem.**, 273, 2617-2623, 1998.
- FLETCHER, B.S.; KUJUBU, D.A.; PERRIN, D.M.; HERSCHMAN, H.R. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. **J. Biol. Chem.**, 267, 4338-4344, 1992.
- FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. **Br. J. Pharmacol.**, 87, 57-62, 1986.
- FRÖDE-SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B. Synergistic antiinflammatory effect of NF- κ B inhibitors and steroid or non steroid antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. **Inflamm. Res.**, 49, 330-337, 2000.
- FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and supression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, 265, 16737-16740, 1990.
- FUTAKI, N.; TAKAHASHI, S.; YOKOYAMA, M.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; OTOMO, S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity *in vitro*. **Prostaglandins**, 47, 55-59, 1994.
- GALLIZZI, J.P.; BODINIER, M.C.; CHAPELAIN, B.; LY, S.M.; COUSSY, L.; GIREAUD, S.; NELIAT, S.; JEAN, T. Up-regulation of [³H]-des-Arg¹⁰-kallidin binding to the bradykinin B₁ receptor by interleukin-1 β in isolated smooth muscle cells: correlation with B₁ agonist-induced PGI₂ production. **Br. J. Pharmacol.**, 113, 389-396, 1994.
- GENG, Y.; BLANCO, F.J.; CORNELISSON, M.; LOTZ, M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. **J. Immunol.**, 155, 796-801, 1995.
- GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, 16, 225-260, 1998.
- GIGUERE, V.; HOLLENBERG, S.M.; ROSENFELD, M.G.; EVANS, R.M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. **Cell**, 46, 645-652, 1986.
- GOLBEIL, 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.
- GOPPELT-STRUEBE, M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochem. Pharmacol.**, 53, 1389-1395, 1997.

- GOUJON, E.; PARNET, P.; LAYE, S.; COMBE, C.; DANTZER, R. Adrenalectomy enhances pro-inflammatory cytokines gene expression, in the spleen, pituitary and brain of mice in response to lipopolysaccharide. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, 36, 53-62, 1996.
- GRISCAVAGE, J.M.; WILK, S.; IGNARRO, L.J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 3308-3312, 1996
- GRYGLEWSKI, R.J.; PANCZENKO, B.; KORBUT, R.; GRODZINSKA, L.; OCETKIEWICZ, A. Corticosteroids inhibit prostaglandin release from perfused mesenteric blood vessels of rabbit and from perfused lungs of sensitized guinea pig. **Prostaglandins**, 10, 343-355, 1975.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, 56, 131-190, 1992.
- HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. **The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors**. In: FARMER, S.C. (Ed.), *The kinin System*, Academic Press, San Diego, p. 9-43, 1997.
- HAWES, B.E.; VAN BIESEN, T.; KOCH, W.J.; LUTTRELL, L.M.; LEFKOWITZ, R.J. Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. **J. Biol. Chem.**, 270, 17148-17153, 1995.
- HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Eur. Respir. J.**, 16, 452-458, 2000.
- HENDERSON, L.M.; FIGUEROA, C.D.; MULLER-ESTERL, W.; BHOOLA, K.D. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. **Blood**, 84, 474-482, 1994.
- HENDERSON, L.M.; FIGUEROA, C.D.; MULLER-ESTERL, W.; STAIN, A.; BHOOLA, K.D. Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H-kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. **Agents Actions Suppl.**, 38, 590-594, 1992.
- HENDRIKS, D.; WANG, W.; SCHARPE, S.; LOMMAERT, M.P.; VAN SANDE, M. Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum. **Biochim. Biophys. Acta**, 1034, 86-92, 1990.
- HENRY, D.; DOBSON, A.; TURNER, C. Variability in the risk of major gastrointestinal complications from nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Gastroenterology**, 105, 1078-1088, 1993.
- HERMANN, A.; ARNHOLD, M.; KRESSE, H.; NETH, P.; FINK, E. Expression of components of the kallikrein-kinin system in human cell lines. **Immunopharmacol.**, 45, 135-139, 1999.
- 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.; BORKOWSKI, J.A.; YOUNG, G.S.; STRADER, C.D.; RANSOM, R.W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (bradykinin-2) receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 184, 260-268, 1992.
- HOCK, F.J.; WIRTH, K.; ALBUS, U.; LINZ, W.; GERHARDS, H.J.; WIEMER, G.; HENKE, S.; BREIPOHL, G.; KONIG, W.; KNOLLE, J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. **Br. J. Pharmacol.**, 102, 769-773, 1991.
- HONDA, S.; MIGITA, K.; HIRAI, Y.; UEKI, Y.; YAMASAKI, S.; URAYAMA, S.; KAWABE, Y.; FUKUDA, T.; KAWAKAMI, A.; KAMACHI, M.; KITA, M.; IDA, H.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 268, 928-931, 2000.
- ISRAEL, A. The IKK complex: an integrator of all signals that activates NF- κ B? **Trends Cell Biol.**, 10, 129-133, 2000.
- KARIN, M.; BEM NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annu. Rev. Immunol.**, 18, 621-663, 2000.
- KATO, K.; ITO, H.; KAMEI, K.; IWAMOTO, I. Stimulation of the stress-induced expression of stress proteins by curcumin in cultured cells and in rat tissues *in vivo*. **Cell Stress Chaperones**, 3, 152-160, 1998.
- KELLER-WOOD, M.E.; DALLMAN, M.F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr. Rev.**, 5, 1-24, 1984.
- KELLER-WOOD, M.E.; SHINSAKO, J.; DALLMAN, M.F. Feedback inhibition of adrenocorticotrophic hormone by physiological increases in plasma corticosteroids in conscious dogs. **J. Clin. Invest.**, 71, 859-866, 1983.
- KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, 265, 956-959, 1994.
- KOSAKA, T.; MIYATA, A.; IHARA, H.; HARA, S.; SUGIMOTO, T.; TAKEDA, O.; TAKAHASHI, E.; TANABE, T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. **Eur. J. Biochem.**, 221, 889-897, 1994.
- KOZIK, A.; MOORE, R.B.; POTEMPA, J.; IMAMURA, T.; RAPALA-KOZIK, M.; TRAVIS, J. A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. **J. Biol. Chem.**, 273, 33224-33229, 1998.
- KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumorpromoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, 266, 12866-12872, 1991.
- KUJUBU, D.A.; HERSCHMAN, H.R. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J. Biol. Chem.**, 267, 7991-7994, 1992.

- KUTCHERA, W.; JONES, D.A.; MATSUNAMI, N.; GRODEN, J.; MCINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; WHITE, R.L.; PRESCOTT, S.M. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 4816-4820, 1996.
- 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.
- LAL, M.A.; PROULX, P.R.; HEBERT, R.L. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. **Am. J. Physiol.**, 274, F728-F735, 1998.
- LAMONTAGNE, D.; NADEAU, R.; ADAM, A. Effect of enalaprilat on bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin release following reperfusion of the ischaemic rat heart. **Br. J. Pharmacol.**, 115, 476-478, 1995.
- LARRIVÉE, 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.
- LEVESQUE, L.; DRAPEAU, G.; GROSE, J.H.; RIOUX, F.; MARCEAU, F. Vascular mode of action of kinin B₁ receptors and development of a cellular model for the investigation of these receptors. **Br. J. Pharmacol.**, 109, 1254-1262, 1993.
- LEVESQUE, L.; LARRIVÉE, J.F.; BACHVAROV, D.R.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 116, 1673-1679, 1995.
- LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B.A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Pharmacol. Rev.**, 47, 25-49, 1995.
- LIU, S.F.; YE, X.; MALIK, A.B. *In vivo* inhibition of nuclear factor- κ B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. **J. Immunol.**, 159, 3976-3983, 1997.
- LIU, S.F.; YE, X.; MALIK, A.B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *In vivo* expression of proinflammatory genes. **Circulation**, 100, 1330-1337, 1999.
- MA, J.X.; WANG, D.Z.; CHAO, L.; CHAO, J. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B₂ receptor. **Gene**, 149, 283-288, 1994b.
- MA, J.X.; WANG, D.Z.; WARD, D.C.; CHEN, L.; DESSAI, T.; CHAO, J.; CHAO, L. Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B₂ receptor. **Genomics**, 23, 362-369, 1994a.
- MACDONALD, R.J.; MARGOLIUS, H.S.; ERDOS, E.G. Molecular biology of tissue kallikrein. **Biochem. J.**, 253, 313-321, 1988.

- MACNEIL, T.; BIERILO, K.K.; MENKE, J.G.; HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1264, 223-228, 1995.
- MADEDDU, P.; SALIS, M.B.; EMANUELI, C. Altered baroreflex control of heart rate in bradykinin B₂-receptor knockout mice. **Immunopharmacol.**, 45, 21-27, 1999.
- MADEDDU, P.; VARONI, M.V.; PALOMBA, D.; EMANUELI, C.; DEMONTIS, M.P.; GLORIOSO, N.; DESSI-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; ANANIA, V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B₂-receptor gene. **Circulation**, 96, 3570-3578, 1997.
- MAHABEER, R.; BHOOLA, K.D. Kallikrein and kinin receptor genes. **Pharmacol. Ther.**, 88, 77-89, 2000.
- MAKAROV, S.S. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Mol. Med. Today**, 5, 441-448, 2000.
- MALKOSKI, S.P.; HANDANOS, C.M.; DORIN, R.I. Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. **Mol. Cell Endocrinol.**, 127, 189-199, 1997.
- MANDLE, R.J.; COLMAN, R.W.; KAPLAN, A.P. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 73, 4179-4183, 1976.
- MARCEAU, F. Is there a role for bradykinin in the therapeutic and side effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors? **Can. J. Cardiol.**, 13, 187-194, 1997.
- MARCEAU, F. Kinin B₁-receptors: A review. **Immunopharmacol.**, 30, 1-26, 1995.
- MARCEAU, F.; BACHVAROV, D.R. Kinin receptors. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, 16, 385-401, 1998.
- MARCEAU, F.; BROCHU, S.; PELLETIER, I.; DRAPEAU, G.; ADAM, A.; LEBEL, M. Inflammatory peptides at the beginning of hemodialysis in asymptomatic patients treated or not with angiotensin I-converting inhibitors. **Nephron**, 71, 474-476, 1995.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B₁ receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.**, 50, 357-386, 1998.
- MARCEAU, F.; LARRIVÉE, J.F.; BOUTHILLIER, J.; BACHVAROVA, M.; HOULE, S.; BACHVAROV, D.R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B₁ and B₂ receptor expression in the rabbit. **Am. J. Physiol.**, 277, R1568-R1578, 1999.
- 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.

- MASFERRER, J.L.; REDDY, S.T.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, K.; NEEDLEMAN, P.; GILBERT, R.S.; HERSCHMAN, H.R. *In vivo* glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 270, 1340-1344, 1994.
- MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B.; NEEDLEMAN, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89, 3917-3921, 1992.
- MATTSON, M.P.; CULMSEE, C.; YU, Z.; CAMANDOLA, S. Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. **J. Neurochem.**, 74, 443-456, 2000.
- MCEACHERN, A.E.; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKA, J.; ALDRICH, R.W.; JARNAGIN, K. Expression cloning of a rat B₂ receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 88, 7724-7728, 1991.
- MCLEAN, P.G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin B(1) 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 endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation. **Br. J. Pharmacol.**, 128, 275-282, 1999.
- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269, 21583-21586, 1994.
- MIAGKOV, A.V.; KOVALENKO, D.V.; BROWN, C.E.; DIDSBURY, J.R.; COGSWELL, J.P.; STIMPSON, S.A.; BALDWIN, A.S.; MAKAROV, S.S. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95, 13859-13864, 1998.
- MITCHELL, J.A.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T.J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochem. Pharmacol.**, 50, 1535-1542, 1995.
- MOORE, R.N.; PENNEY, D.P.; AVERILL, K.T. Fine structural and biochemical effects of aminoglutethimide and o,p'-DDD on rat adrenocortical carcinoma 494 and adrenals. **Anat. Rec.**, 198, 113-124, 1980.
- MORI, S.; RONNSTRAND, L.; YOKOTE, K.; ENGSTROM, A.; COURTNEIDGE, S.A.; CLAESSION-WELSH, L.; HELDIN, C.H. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. **EMBO J.**, 12, 2257-2264, 1993.

- MORISHITA, R.; SUGIMOTO, T.; AOKI, M.; KIDA, I.; TOMITA, N.; MORIGUCHI, A.; MAEDA, K.; SAWA, Y.; KANEDA, Y.; HIGAKI, J.; OGIHARA, T. *In vivo* transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. **Nat. Med.**, 3, 894-899, 1997.
- MOTTA, G.; SAMPAIO, C.A.; SAMPAIO, U.M. Human plasma kallikrein. Immunoreactivity and activity on natural and synthetic substrates. **Agents Actions Suppl.**, 36, 200-208, 1992.
- MUGRIDGE, K.G.; PERRETTI, M.; BECHERUCCI, C.; PARENTE, L. Persistent effects of interleukin-1 on smooth muscle preparations from adrenalectomized rats: implications for increased phospholipase-A₂ activity via stimulation of 5-lipoxygenase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 256, 29-37, 1991.
- MULLER, D.N.; DECHEND, R.; MERVAALA, E.M.; PARK, J.K.; SCHMIDT, F.; FIEBELER, A.; THEUER, J.; BREU, V.; GANTEN, D.; HALLER, H.; LUFT, F.C. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. **Hypertension**, 35, 193-201, 2000.
- MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocr. Rev.**, 5, 25-44, 1984.
- NAKANO, H.; SHINDO, M.; SAKON, S.; NISHINAKA, S.; MIHARA, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95, 3537-3542, 1998.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 128, 853-859, 1999.
- NEURATH, M.F.; PETTERSSON, S.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H.; STROBER, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. **Nat. Med.**, 2, 998-1004, 1996.
- NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, 55, 603-613, 2000.
- NGUYEN, K.T.; DEAK, T.; WILL, M.K.; HUNSAKER, B.N.; FLESHNER, M.; WATKI, L.R.; MAIER, S.F. Timecourse and corticosterone sensitivity of the brain, pituitary and serum interleukin-1beta protein response to acute stress. **Brain Res.**, 859, 193-201, 2000.
- NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor-kappaB regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. **Biochem. Mol. Bio.**, 273, 2784-2791, 1998.

- O'BANION, M.K.; WINN, V.; YOUNG, D.A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89, 4888-4892, 1992.
- OAKLEY, R.H.; CIDLOWSKI, J.A. Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, 3, 63-88, 1993.
- ODYA, C.E.; CARLIN, R.J.; YAPA, R.D.; SOLTANI-TEHRANI, B. Immunoassays for des-Arg⁹-bradykinin. **J. Immunoassay.**, 14, 227-240, 1993.
- PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF κ B transcription factors. **Oncogene**, 18, 6853-6947, 1999.
- PAN, Z.K.; CHRISTIANSEN, S.C.; PTASZNIK, A.; ZURAW, B.L. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for bradykinin stimulation of NF-kappaB activation in cultured human epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, 274, 9918-9922, 1999.
- 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-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells. **J. Immunol.**, 160, 3038-3045, 1998.
- PAPP, M.; KASE, H.; GIGLER, G. Antiinflammatory effect of a protein kinase C inhibitor (K-252a) on the development of the dextran-induced paw edema in the rat (preliminary results). **Acta Physiol. Hung.**, 80, 423-425, 1992.
- PARRETT, M.L.; HARRIS, R.E.; JOARDER, F.S.; ROSS, M.S.; CLAUSEN, K.P.; ROBERTSON, F.M. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. **Int. J. Oncol.**, 10, 503-507, 1997.
- PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.JR.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97, 8140-8145, 2000.
- PESQUERO, J.B.; BADER, M. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31, 1197-1203, 1998.
- PESQUERO, J.B.; LINDSEY, C.J.; ZEH, K.; PAIVA, A.C.; GANTEN, D.; BADER, M. Molecular structure and expression of rat bradykinin B₂ receptor gene. Evidence for alternative splicing. **J. Biol. Chem.**, 269, 26920-26925, 1994.
- 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. Res. Commun.**, 220, 219-225, 1996.
- PHAGOO, S.B.; POOLE, S.; LEEB-LUNDBERG, L.M. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. **Mol. Pharmacol.**, 56, 325-333, 1999.

- PINKUS, R.; WEINER, L.M.; DANIEL, V. Role of antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B and glutathione S-transferase gene expression. **J. Biol. Chem.**, 271, 13422-13429, 1996.
- PLENDL, J.; SNYMAN, C.; NAIDOO, S.; SAWANT, S.; MAHABEER, R.; BHOOLA, K.D. Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells. **Biol. Chem.**, 381, 1103-1115, 2000.
- PORTANOVA, J.P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S.A.; ISAKSON, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, 184, 883-891, 1996.
- POWELL, S.J.; SLYNN, G.; THOMAS, C.; HOPKINS, B.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. **Genomics**, 15, 435-438, 1993.
- PRATT, W.B. The role of heat shock proteins in regulation the function , folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. **J. Biol. Chem.**, 268, 21445-21458, 1994.
- PROUD, D. The kinin system in rhinitis and asthma. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, 16, 351-364, 1998.
- PROUD, D.; KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Annu. Rev. Immunol.**, 6, 49-83, 1988.
- PROUD, D.; MACGLASHAN, D.W.; NEWBALL, H.H.; SCHULMAN, E.S.; LICHTENSTEIN, L.M. Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 132, 405-408, 1985.
- PYNE, N.J.; TOLAN, D.; PYNE, S. Bradykinin stimulates cAMP synthesis via mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of cytosolic phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ release in airway smooth muscle. **Biochem. J.**, 328, 689-694, 1997.
- RAIDOO, D.M.; BHOOLA, K.D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. **Pharmacol. Ther.**, 79, 105-127, 1998.
- RAJASEKARIAH, P.; WARLOW, R.S.; WALLS, R.S. High affinity bradykinin binding to human inflammatory cells. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 43, 279-290, 1997.
- REGOLI, D. Toward a new inflammatory and analgesic agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97, 7676-7677, 2000.
- REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32, 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; BARABE, J.; PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 55, 855-867, 1977.

- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; ROVERO, P.; DION, S.; RHALEB, N.E.; BARABE, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; WARD, P. Conversion of kinins and their antagonists into B₁ receptor activators and blockers in isolated vessels. **Eur. J. Pharmacol.**, 127, 219-224, 1986.
- REGOLI, D.C.; MARCEAU, F.; LAVIGNE, J. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.**, 71, 105-115, 1981.
- REYMOND, P.; DRAPEAU, G.; RAUT, R. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. **J. Immunol. Methods**, 180, 247-257, 1995.
- RIENDEAU, D.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; MANCINI, J.A.; WONG, E.; GUAY, J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 75, 1088-1095, 1997.
- RITCHIE, R.H.; MARSH, J.D.; SCHIEBINGER, R.J. Bradykinin-stimulated protein synthesis by myocytes is dependent on the MAP kinase pathway and p70(S6K). **Am. J. Physiol.**, 276, H1393-H1398, 1999.
- RIVIER, C.; PLOTSKY, P.M. Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. **Annu. Rev. Physiol.**, 48, 475-494, 1986.
- RIZZI, A.; RIZZI, C.; AMADESI, S.; CALO, G.; VARANI, K.; INAMURA, N.; REGOLI, D. Pharmacological characterization of the first non-peptide bradykinin B₂ receptor agonist FR 190997: an in vitro study on human, rabbit and pig vascular B₂ receptors. **Naum. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 360, 361-367, 1999.
- ROBERT, R.A.; GULIK, W.J. Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis by expression of mutant ras oncogene. **J. Cell Sci.**, 94, 527-535, 1989.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; RSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, 156, 261-173, 1949.
- ROCHE, S.; KOEGL, M.; BARONE, M.V.; ROUSSEL, M.F.; COURTNEIDGE, S.A. DNA synthesis induced by some but not all growth factors requires Src family protein tyrosine kinases. **Mol. Cell. Biol.**, 15, 1102-1109, 1995.
- RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. **Br. J. Pharmacol.**, 122, 59-701, 1997.
- RUPNIAK, N.M.; BOYCE, S.; WEBB, J.K.; WILLIAMS, A.R.; CARLSON, E.J.; HILL, R.G.; BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F. Effects of the bradykinin B₁ receptor antagonist des-Arg⁹[Leu⁸]bradykinin and genetic disruption of the B₂ receptor on nociception in rats and mice. **Pain**, 71, 89-97, 1997.

- RUSSO-MARIE, F. Glucocorticoid control of eicosanoid synthesis. **Semin. Nephrol.**, 10, 421-429, 1990.
- SALVINO, J.M.; SEOANE, P.R.; DOUTY, B.D.; AWAD, M.M.; DOLLE, R.E.; HOUCK, W.T.; FAUNCE, D.M.; SAWUTZ, D.G. Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B₂ receptor. **J. Med. Chem.**, 36, 2583-2584, 1993.
- SAMADFAM, R.; TEIXEIRA, C.; BKAILY, G.; SIROIS, P.; DE BRUM-FERNANDES, A.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Contribution of B(2) receptors for bradykinin in arthus reaction-induced plasma extravasation in wild-type or B(2) transgenic knockout mice. **Br. J. Pharmacol.**, 129, 1732-1738, 2000.
- SAMADFAM, R.; TEIXEIRA, C.; BKAILY, G.; SIROIS, P.; DE BRUM-FERNANDES, A.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Contribution of B(2) receptors for bradykinin in arthus reaction-induced plasma extravasation in wild-type or B(2) transgenic knockout mice. **Br. J. Pharmacol.**, 129, 1732-1738, 2000.
- SCHANSTRA, J.P.; BATALLE, E.; CASTAÑO, M.E.M.; BARASCUD, Y.; HIRTZ, C.; PESQUERO, J.B.; PECHER, C.; GAUTHIER, F.; GIROLAMI, J.-P.; BASCANDS, J.-L. The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. **J. Clin. Invest.**, 101, 2080-2091, 1998.
- SCHEINMAN, R.I.; GUALBERTO, A.; JEWELL, C.M.; CIDLOWSKI, J.A.; BALDWIN, A.S.JR. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappaB by activated glucocorticoid receptors. **Mol. Cell Biol.**, 15, 943-953, 1995.
- SCHINI-KERTH, V.B.; BOESE, M.; BUSSE, R.; FISSLTHALER, B.; MULSCH, A. N-alpha-tosyl-L-lysine chloromethylketone prevents expression of iNOS in vascular smooth muscle by blocking activation of NF-kappa B. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 17, 672-679, 1997.
- SCHMIDLIN, F.; LOEFFLER, S.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y.; GIES, J.P. PLA₂ phosphorylation and cyclooxygenase-2 induction, through p38 MAP kinase pathway, is involved in the IL-1beta-induced bradykinin B₂ receptor gene transcription. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 361, 247-254, 2000.
- SCHMIDLIN, F.; SCHERRER, D.; DAEFFLER, L.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y.; GIES, J.P. Interleukin-1beta induces bradykinin B₂ receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol.**, 53, 1009-1015, 1998.
- SCHMIDT, K.N.; PODDA, M.; PACKER, L.; BAEUERLE, P.A. Anti-psoriatic drug anthralin activates transcription factor NF- κ B in murine keratinocytes. **J. Immunol.**, 156, 4514-4519, 1996.

- SCHRECK, R.; MEIER, B.; MANNEL, D.N.; DROGE, W.; BAUERLE, P.A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. **J. Exp. Med.**, 175, 1181-1194, 1992.
- SCHREMMER-DANNINGER, E.; OFFNER, A.; SIEBECK, M.; ROSCHER, A.A. B₁ bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 243, 246-252, 1998.
- SCHULICK, R.D.; BRENNAN, M.F. Adrenocortical carcinoma. **JAMA**, 238, 2527-2532, 1977.
- SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 12013-12017, 1994.
- SHAMES, B.D.; MELDRUM, D.R.; SELZMAN, C.H.; PULIDO, E.J.; CAIN, B.S.; BANERJEE, A.; HARKEN, A.H.; MENG, X. Increased levels of myocardial I κ B- α protein promote tolerance to endotoxin. **Am. J. Physiol.**, 275, H1084-H1091, 1998.
- SHENG, H.; SHAO, J.; HOOTON, E.B.; TSUJII, M.; DUBOIS, R.N.; BEAUCHAMP, R.D. Cyclooxygenase-2 induction and transforming growth factor- β growth inhibition in rat intestinal epithelial cells. **Cell Growth Different.**, 8, 463-468, 1997.
- SIEBECK, M.; WHALEY, E.T.; HOFFMANN, H.; WEIPERT, J.; FRITZ, H. The hypotensive response to des-Arg⁹-bradykinin increases during *E. coli* septicemia in the pig. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 247, 389-399, 1989.
- SIROIS, J.; LEVY, L.O.; SIMMONS, D.L.; RICHARDS, J.S. Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. **J. Biol. Chem.**, 268, 12199-12206, 1993.
- STRAHLE, U.; SCHMID, W.; SCHUTZ, G. Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. **EMBO J.**, 11, 3389-3395, 1988.
- SUBBARAMAIAH, K.; TELANG, N.; RAMONETTI, J.T.; ARAKI, R.; DEVITO, B.; WEKSLER, B.B.; DANNENBERG, A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. **Cancer Res.**, 56, 4424-4429, 1996.
- TAKANO, M.; YOKOYAMA, K.; YAYAMA, K.; OKAMOTO, H. Rat fibroblasts synthesize T-kininogen in response to cyclic-AMP, prostaglandin E₂ and cytokines. **Biochim. Biophys. Acta**, 1268, 107-114, 1995.
- TAKEDO, M.; KOKOYAMA, S.; ROCHELLE, J.; KIMURA, Y.; HIGASHIDA, H.; TAKELTO, M.; SELDIN, M.F. Mouse B₂ bradykinin receptor gene maps to distal chromosome 12. **Genomics**, 27, 222-223, 1995.
- TALLEY, J.J. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). **Prog. Med. Chem.**, 36, 201-234, 1999.

- TILDERS, F.J.H.; DE RIJK, R.H.; VAN DAM, A.M.; VINCENT, V.A.; SCHOTANUS, K.; PERSOONS, J.H.A. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. **Psychoneuroendocrinology**, 19, 209-232, 1994.
- TOKUMASU, T.; UENO, A.; OH-ISHI, S. A hypotensive response induced by des-Arg9-bradykinin in young Brown/Norway rats pretreated with endotoxin. **Eur. J. Pharmacol.**, 274, 225-233, 1995.
- TOMITA, T.; TAKEUCHI, E.; TOMITA, N.; MORISHITA, R.; KANEKO, M.; YAMAMOTO, K.; NAKASE, T.; SEKI, H.; KATO, K.; KANEDA, Y.; OCHI, T. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. **Arthritis Rheum.**, 42, 2532-2542, 1999.
- TURNBULL, A.V.; RIVIER, C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress CRF receptors, binding protein and related peptides. **Proc. Exp. Biol. Med.**, 215, 1-10, 1997.
- TURNBULL, A.V.; RIVIER, C. Regulation of the HPA axis by cytokines. **Brain Behav. Immun.**, 9, 253-75, 1995.
- TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol. Rev.**, 79, 1-71, 1999.
- VALE, W.; SPEISS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-amino acid residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and β endorphin. **Science**, 213, 1394-1397, 1981.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 38, 97-120, 1998.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Regulatory mechanisms of the vascular endothelium: an update. **Pol. J. Pharmacol.**, 46, 499-421, 1994.
- VARVREK, R.; STUART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides**, 6, 161-164, 1985.
- WAHL, C.; LIPTAY, S.; ADLER, G.; SCHMID, R.M. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. **J. Clin. Invest.**, 101, 1163-1174, 1998.
- WANG, D.Z.; CHAO, L.; CHAO, J. Cellular localization of bradykinin B₁ receptor mRNA in the human kidney. **Immunopharmacol.**, 33, 151-156, 1996.
- WANG, D.Z.; MA, J.X.; CHAO, L.; CHAO, J. Molecular cloning and sequence analysis of rat bradykinin B₂ receptor gene. **Biochim. Biophys. Acta**, 1219, 171-174, 1994.
- WATANABE, T.; MAKISUMI, T.; MACARI, M.; TAN, N.; NAKAMORI, T.; NAKAMURA, S.; MURAKAMI, N. Febrile responses induced in adrenalectomized rats by administration of interleukin-1 beta or prostaglandin E₂. **J. Physiol.**, 484, 767-775, 1995.

- WEBER, C.K.; LIPTAY, S.; WIRTH, T.; ADLER, G.; SCHMID, R.M. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. **Gastroenterology**, 119, 1209-1218, 2000.
- WEBSTER, J.C.; CIDLOWSKI, A. Mechanisms of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression. **TEM**, 10, 396-402, 1999.
- WERLE, E.; TRAUTCHOLD, I.; LEYSATH, G. Isolierung und struktur des kallidin. **Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.**, 326, 174-176, 1961.
- WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R.; GILROY, D. Resolution of inflammation. **Int. J. Immunopharmacol.**, 22, 1131-1135, 2000.
- WIRTH, K.; BREIPOHL, G.; STECHL, J.; KNOLLE, J.; HENKE, S.; SCHOLKENS, B. Des-Arg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-bradykinin (desArg¹⁰-[Hoe140]) is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 205, 217-218, 1991.
- XIE, Q.W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** 269, 4705-4708, 1994.
- XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Sci. USA**, 88, 2692-2696, 1991.
- YAMAMOTO, K.; ARAKAWA, T.; UEDA, N.; YAMAMOTO, S. Transcriptional roles of nuclear factor-kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor α -independent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. **J. Biol. Chem.**, 270, 31315-31320, 1995.
- YANG, X.; TAYLOR, L.; POLGAR, P. Mechanisms in the transcriptional regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. **J. Bio. Chem.**, 273, 10763-10770, 1998.
- YANG, Y.H.; HUTCHINSON, P.; LEECH E MORAND, E.F. Exacerbation of adjuvant arthritis by adrenalectomy is associated with reduced leukocyte lipocortin 1. **J. Rheumatol.**, 24, 1758-1764, 1997.
- YOKOYAMA, S.; KIMURA, Y.; TAKEDO, M.; BLACK, J.A.; RANSOM, B.R.; HIGASHIDA, H. B₂ bradykinin receptors in NG108-15 cells: cDNA cloning and functional expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 200, 634-641, 1994.
- YOUNG, W.S.; MEZEY, E.; SIEGEL, R.E. Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. **Neurosc. Lett.**, 70, 198-203, 1986.
- ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 283, 1069-1075, 1997.

ZHOU, X.; POLGAR, P.; TAYLOR, L. Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. **Biochem. J.**, 330, 361-366, 1998.

ZUZACK, J.S.; BURKARD, M.R.; CUADRADO, D.; GREER, R.A.; SELIG, W.M.; WHALLEY, E.T. Evidence of a Bradykinin B₁ receptor in human ileum: comparison to the rabbit aorta B₁ receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277, 1337-1348, 1996.