

Evelise Fernandes Pietrovski

PAPEL DAS CININAS NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS CUTÂNEOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio

CURITIBA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Esta tese de Doutorado foi realizada no Laboratório de Dor, Febre e Inflamação, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná com apoio financeiro da CAPES.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

(Leonardo da Vinci)

Ao meu marido, Jefferson Augusto Soletti, pelo amor, incentivo e compreensão que foi essencial para a realização deste trabalho

Aos meus pais, Gilberto e Eliane, e às minhas irmãs, Caroline e Louise, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini, pela orientação competente, por todos os ensinamentos e pela dedicação na minha formação durante esta caminhada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio, por tornar possível a realização do doutorado, por todos os ensinamentos e contribuições.

Ao Prof. Dr. Michel Fleith Otuki pela grande contribuição na realização desta tese, pelos conhecimentos ensinados e pelas importantes sugestões.

A Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques por ter me acompanhado desde o início da minha formação e por sempre ter me indicado o caminho a seguir.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero da Universidade Federal de São Paulo por ter cedido gentilmente os animais nocaute e por ter me recebido em seu laboratório.

As minhas amigas Alliete, Franciane, Laryssa, Cíntia, Ana Clara, Renata, Fernanda e Shirley que compartilharam comigo muitos momentos importantes, com certeza vocês tornaram tudo mais leve e agradável.

Aos amigos do laboratório e do departamento pela amizade que se formou e por toda ajuda para realização deste projeto.

A Kátia e ao Fernando do Departamento de Biologia Celular que não mediram esforços em ajudar-me e agradeço também pela amizade.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia e aos professores da área pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos servidores do Departamento de Farmacologia.

Aos animais utilizados nos experimentos.

A CAPES pelo apoio financeiro

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. A Pele.....	1
1.2. Cininas	9
2 OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Animais	19
3.2. Avaliação do Edema de Orelha	19
3.3. Avaliação da Participação das Cininas em Modelos de Inflamação Cutânea	20
3.4. Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de TPA	21
3.5. Medida da Atividade Enzimática da Mieloperoxidase (MPO).....	22
3.6. Medida da Atividade Enzimática da n-acetil- β -D Glucosaminidase (NAG).....	22
3.7. Análise Histológica	23
3.8. Extração de proteínas citosólicas e nucleares	24
3.9. Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de <i>Western Blot</i>	24
3.10. Avaliação dos níveis da proteína PCNA por Imunohistoquímica.....	25
3.11. Análise Estatística	26
3.12. Drogas e Reagentes.....	26
4 RESULTADOS	28
4.1. Efeito das Cininas em Modelos de Inflamação Cutânea	28
4.1.1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina	28
4.1.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (AA)	33
4.1.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA.....	34
4.1.4. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA	42
4.1.5. Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de Western Blot.....	50
4.1.6. Avaliação dos níveis da proteína PCNA por imunohistoquímica	51
4.1.7. Avaliação dos antagonistas SSR 240612 e FR 173657 no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA.....	53

5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS	75
8 ANEXO	92
8.1. Publicações.....	92
8.1.1. Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese:	92
8.1.2. Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese:	92

LISTA DE ABREVIATURAS

Cdks	quinases dependentes de ciclinas
K6	queratina 6
K16	queratina 16
K5	queratina 5
K14	queratina 14
K1	queratina 1
K10	queratina 10
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
PKC	proteína quinase C
PKA	proteína quinase A
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
NF- κ B	fator nuclear-kappa B
CLA	antígeno linfocitário cutâneo
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
PUVA	psoraleno e radiação UVA
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
BK	bradicinina
APM	cininogênio de alto peso molecular
BPM	cininogênio de baixo peso molecular
ECA	enzima conversora de angiotensina
APP	aminopeptidase P
NEP	endopeptidase neutral
CPM	carboxipeptidase M

CPN	carboxipeptidase N
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
IL	interleucina
RNAm	RNA mensageiro
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-acetato
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
+/+	animais selvagem
B ₁ ^{-/-}	animais nocaute para o receptor B ₁
B ₂ ^{-/-}	animais nocaute para o receptor B ₂
B ₁ B ₂ ^{-/-}	animais duplo nocaute
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LTC ₄	leucotrieno C ₄
LTD ₄	leucotrieno D ₄
NAG	n-acetil-β-D-glucosaminidase
MPO	mieloperoxidase
i.p.	intraperitoneal
TRPV1	receptor vanilóide do tipo 1
VIP	peptídeo vasoativo intestinal
AA	ácido araquidônico
LPS	lipopolissacarídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de uma secção transversal da pele.....	2
Figura 2:	Síntese dos peptídeos ativos gerados pelo sistema calicreína-cinina e suas interações com os receptores.....	11
Figura 3:	Curva de padronização da capsaicina.....	28
Figura 4:	Efeito dos antagonistas peptídicos no edema de orelha induzido pela capsaicina.....	29
Figura 5:	Efeito dos antagonistas não-peptídicos aplicados topicamente no edema de orelha induzido pela capsaicina.....	30
Figura 6:	Avaliação da resposta dos animais nocaute no edema de orelha induzido pela capsaicina.....	32
Figura 7:	Avaliação dos antagonistas e dos animais nocaute para os receptores das cininas no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico.....	34
Figura 8:	Avaliação dos antagonistas para os receptores das cininas no edema de orelha induzido pelo TPA.....	36
Figura 9:	Resposta dos animais nocaute no edema de orelha induzido pelo TPA.....	37
Figura 10:	Fotos representativas das orelhas dos animais nocaute 6 h após a aplicação aguda de TPA.....	38
Figura 11:	Avaliação histológica após 6 h da aplicação de TPA.....	39
Figura 12:	Avaliação histológica após 24 h da aplicação de TPA.....	40
Figura 13:	Avaliação da atividade da enzima MPO após a aplicação aguda de TPA nos animais nocaute.....	41
Figura 14:	Quantificação de neutrófilos 24 h após a aplicação aguda de TPA nos animais nocaute para os receptores das cininas.....	41
Figura 15:	Efeito da aplicação múltipla de TPA nos animais nocaute.....	44
Figura 16:	Fotos representativas das orelhas dos animais nocaute após a aplicação crônica de TPA.....	45
Figura 17:	Avaliação histológica após 4 dias da aplicação crônica de TPA.....	46
Figura 18:	Avaliação histológica no nono dia após a aplicação crônica de TPA.....	47

Figura 19:	Avaliação da espessura da pele após a aplicação crônica de TPA.....	48
Figura 20:	Avaliação da atividade enzimática nos animais nocaute após a aplicação múltipla de TPA.....	49
Figura 21:	Quantificação de leucócitos após a aplicação crônica de TPA nos animais nocaute para os receptores das cininas.....	50
Figura 22:	Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de Western Blot após aplicação crônica de TPA.....	51
Figura 23:	Avaliação dos níveis da proteína PCNA por Imunohistoquímica após aplicação crônica de TPA.....	52
Figura 24:	Quantificação da marcação da proteína PCNA por Imunohistoquímica...	53
Figura 25:	Efeito dos antagonistas não-peptídicos no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA.....	55
Figura 26:	Fotos representativas das orelhas dos animais após o tratamento com os antagonistas não-peptídicos no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA.....	56
Figura 27:	Avaliação histológica do efeito dos antagonistas não-peptídicos no modelo do TPA crônico.....	57
Figura 28:	Efeito dos antagonistas não-peptídicos na determinação da espessura da pele.....	58
Figura 29:	Efeito dos antagonistas não-peptídicos na atividade enzimática da MPO e da NAG.....	59
Figura 30:	Efeito dos antagonistas não-peptídicos na quantificação de leucócitos após a aplicação crônica de TPA.....	60

RESUMO

O processo inflamatório na pele é produzido e mantido pela interação de várias células residentes como os queratinócitos e fibroblastos, além de células que migram para o tecido inflamado. É postulado que diferentes estímulos desencadeiam a resposta inflamatória cutânea por estimularem os queratinócitos a produzirem mediadores inflamatórios específicos, como a bradicinina. O presente estudo avaliou a participação das cininas em diferentes modelos de inflamação cutânea. Os resultados obtidos demonstram o envolvimento dos receptores das cininas, B₁ e B₂, na inflamação neurogênica da pele induzida pela capsaicina. Os antagonistas peptídicos para os receptores das cininas administrados por via i.p. inibiram de forma significativa o edema de orelha induzido pela capsaicina. O valor da DI₅₀ calculada para o Hoe 140 foi de 23,83 (9,14 - 62,14) nmol/kg. A inibição observada para o Hoe 140, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e R-715 foi de 61 ± 5%, 56 ± 15% e 65 ± 10%, respectivamente. Além disso, os novos antagonistas não-peptídicos da bradicinina SSR 240612 (seletivo para os receptores B₁) e FR 173657 (seletivo para os receptores B₂) mostraram ser muito potentes *in vivo* quando aplicados topicamente. A DI₅₀ calculada para o SSR 240612 foi de 0,23 (0,15 - 0,36) mg/orelha. A inibição observada para o SSR 240612, FR 173657 e associação do SSR plus FR foi de 53 ± 3%, 48 ± 8% e 52 ± 4%, respectivamente. Os resultados obtidos com os animais nocaute para ambos os receptores das cininas, duplo nocaute, confirmam a participação das cininas na inflamação neurogênica (inibição de 42 ± 7%). Além disso, os antagonistas das cininas também apresentaram uma redução significativa do edema induzido pelo ácido araquidônico (AA). Entretanto, o Hoe 140 e o R-715 somente foram capazes de inibir o edema do AA quando foram administrados de maneira associada, com uma inibição de 36 ± 4%. Neste mesmo modelo, a inibição calculada para o SSR, FR e a associação do SSR e FR foi de 23 ± 10%, 27 ± 6% e 34 ± 12%, respectivamente. Da mesma forma, os animais duplo nocaute apresentaram uma inibição significativa (17 ± 3%) do edema induzido pelo AA. Os resultados mostram que o sistema das cininas está presente na organização da pele, embora não pode ser detectada a participação das cininas no edema induzido pela aplicação aguda de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). Todos os antagonistas avaliados não foram capazes de inibir o edema induzido pelo TPA e os resultados obtidos com os animais nocaute confirmam a ausência da

participação das cininas neste modelo. Entretanto, os animais nocaute apresentaram uma redução da migração celular neste mesmo modelo. Os animais nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e duplo nocaute apresentaram uma redução da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a qual é um marcador indireto da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado, com uma diminuição de 31 ± 5%, 44 ± 12% e 24 ± 10%, respectivamente. Além disso, quando foi utilizado o modelo de inflamação crônica induzido pela múltipla aplicação de TPA, os animais nocaute para o receptor B₁ e nocaute para o receptor B₂ apresentaram aumento do edema e da hiperproliferação celular. Ao contrário, nos animais duplo nocaute não foi verificado aumento desses parâmetros. Quando os níveis da proteína PCNA, um marcador das células em proliferação celular, foram avaliados por western blot, os animais nocaute para o receptor B₂ apresentaram um aumento significativo para a proteína PCNA (22 ± 10%). Entretanto, uma significativa redução dos níveis da proteína PCNA foi observada nos animais duplo nocaute (38 ± 8%). A avaliação histológica e os níveis de expressão da proteína PCNA, também avaliado por imunohistoquímica, confirmam os resultados obtidos e demonstram redução significativa da proliferação celular nos animais duplo nocaute. Entretanto, no modelo de inflamação crônica, os animais nocaute não apresentaram uma redução da migração de neutrófilos e leucócitos mononucleares, os quais foram avaliados pela determinação da atividade das enzimas MPO e da n-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG), respectivamente. Os antagonistas não-peptídicos foram avaliados no mesmo modelo de inflamação crônica e causaram inibição do edema e da proliferação celular. Os antagonistas não-peptídicos; SSR 240612, FR 173657 e SSR plus FR; foram topicamente aplicados e causaram uma inibição significativa da determinação do peso das orelhas após a aplicação múltipla de TPA (14 ± 5%, 23 ± 4% e 22 ± 6%, respectivamente). Na avaliação histológica, os antagonistas apresentaram uma redução da hiperplasia epidermal e da formação de acantoses. Entretanto, os antagonistas não-peptídicos não foram capazes de promover uma alteração da migração celular. Em conjunto, os resultados indicam que os dois receptores das cininas estão presentes na pele e participando na inflamação neurogênica, na resposta do AA e também no processo de proliferação celular.

Palavras-chave: cininas, animais nocaute, edema de orelha, antagonistas para os receptores das cininas, inflamação cutânea, proliferação celular.

ABSTRACT

The skin inflammatory process is produced and maintained by the interaction of several resident cell types as keratinocytes, fibroblasts and cells that migrate to the inflamed tissue. It is postulated that different stimuli trigger a cutaneous inflammatory response by directly inducing epidermal keratinocytes to elaborate specific proinflammatory such as bradykinin. This study investigates the participation of kinin receptors in different models of skin inflammation. Our results show the involvement of both kinin receptors, B₁ and B₂, in skin neurogenic inflammation induced by capsaicin. The peptide kinin receptor antagonists injected i.p. caused a significant inhibition of the capsaicin-induced ear oedema. The calculated ID₅₀ value for Hoe 140 was 23,83 (9,14 - 62,14) nmol/kg. The inhibition observed for Hoe 140, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, and R-715 were 61 ± 5%, 56 ± 15% e 65 ± 10%, respectively. Furthermore, the new kinin non-peptide antagonists SSR 240612 (selective for B₁ receptors) and FR 173657 (selective for B₂ receptors) proved to be very potent in vivo when topically applied. The calculated mean ID₅₀ for SSR 240612 were 0,23 (0,15 - 0,36) mg/ear. The inhibition observed for SSR 240612, FR 173657, and SSR plus FR were 53 ± 3%, 48 ± 8% e 52 ± 4%, respectively. The use of knockout animals for both kinin receptors confirmed kinins involvement in neurogenic inflammation (inhibition of 42 ± 7%). Moreover, all kinin antagonists also showed a significant reduction of arachidonic acid (AA)-induced edema. However, Hoe 140 and R-715 were only capable to inhibit the AA edema when applied together, with inhibition of 36 ± 4%. In the AA-induced oedema, the calculated inhibition for SSR, FR, and SSR plus FR were 23 ± 10%, 27 ± 6%, and 34 ± 12%, respectively. In the same way, double knockout mice presented a significant inhibition (17 ± 3%) of AA-induced ear edema. The results show that the kinin system is present in skin organization, but can not be detected kinin participation in acute edema induced by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) application. All of the examined kinin receptor antagonists were unable to inhibit the oedema induced by TPA and the results from knockout mice confirmed the lack of kinin receptor signaling in this model. However, knockout animals showed a reduction of cell migration in this model. The B₁, B₂, and double kinin receptor knockout mice showed a significant reduction of myeloperoxidase (MPO) activity, that is an indirect marker of neutrophil presence in inflamed tissue, with

reduction of $31 \pm 5\%$, $44 \pm 12\%$, and $24 \pm 10\%$, respectively. Moreover, when chronic inflammation model induced by multiple application of TPA was used, B₁-knockout and B₂-knockout animals showed an increase of edema formation and cellular hyperproliferation. In contrast, in double knockout animals, an increase of these parameters could not be found. When PCNA levels, a marker of cell proliferation, were evaluated by western blot, B₂ knockout mice showed a significant increase of PCNA expression ($22 \pm 10\%$). However a significant reduction of PCNA levels was observed in double knockout mice ($38 \pm 8\%$). Histological evaluation and the levels of PCNA protein expression, also evaluated by immunohistochemistry, confirmed our results and showed a significant reduction of cell proliferation in double knockout animals. However, in chronic inflammatory model, the knockout animals showed no reduction in neutrophils and mononuclear leucocytes migration, which were evaluated by MPO and n-acetyl- β -D glucosaminidase (NAG) activity assay, respectively. The non-peptide antagonist were evaluated in the same model of chronic inflammation and showed an edema inhibition and a reduction of cell proliferation. The non-peptide antagonists; SSR 240612, FR 173657 and SSR plus FR; were topically applied and caused a significant inhibition of ear weight after TPA multiple application ($14 \pm 5\%$, $23 \pm 4\%$ and $22 \pm 6\%$, respectively). In the histological analysis, the antagonists presented a reduction in epidermal hyperplasia and acanthosis formation. However, the non-peptide antagonists were unable to promote a alteration in cell migration. Therefore, taken together, the results indicate that both receptors are present in skin and participating in neurogenic inflammation, AA response, and in cell proliferation process.

Key words: kinins, knockout mice, ear oedema, kinin receptor antagonists, cutaneous inflammation, cell proliferation.

1 INTRODUÇÃO

1.1. A Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e por ser a interface com o meio externo é constantemente sujeita a lesões, invasão de patógenos que podem gerar diversas desordens inflamatórias. O processo inflamatório cutâneo é iniciado para promover a resolução de um desequilíbrio da homeostase da pele. Por isso, juntamente com sinais pró-inflamatórios, são gerados mecanismos para inibir este processo. A falha destes mecanismos pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver processos inflamatórios crônicos (WILLIAMS e KUPPER, 1996; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

As camadas que compõe a pele são três: a epiderme, a derme e a hipoderme. A camada de superfície (epiderme) é formada por células epiteliais estratificadas que está sobre a camada do tecido conectivo (derme). Por sua vez a epiderme e a derme estão fixadas em uma camada composta por tecido adiposo: a hipoderme (Figura 1) (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

A epiderme é uma camada estratificada de células epiteliais escamosas, cujo principal componente é o queratinócito. A epiderme é composta das seguintes camadas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. A diferenciação das células ocorre da camada basal à camada córnea. A camada basal contém "*stem cells*" (células tronco) e células transitórias. Essa camada interage com a membrana basal que exerce influência sobre a taxa de proliferação. A camada basal é composta predominantemente de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, e separa a epiderme da derme. As camadas seguintes da epiderme são formadas de queratinócitos em processo de diferenciação terminal. O queratinócito migra da camada basal, adquirindo gradualmente quantidades crescentes da proteína fibrosa, queratina e tornando-se gradativamente mais achatado. Quando atinge a superfície os queratinócitos transformam-se num invólucro morto de queratina, formando a camada córnea. Esta camada é formada pelos queratinócitos na etapa final de diferenciação. Esta etapa está associada a profunda mudanças que ocorre nos queratinócitos, resultando na sua transformação em células planas e anucleadas que são chamadas de corneócitos. Estas células anucleadas compõem a camada córnea e contém no seu interior filamentos de queratina e são circundadas por um envelope celular composto de proteínas com ligações cruzadas (envelope cornificado). A camada córnea

possui a importante função de barreira entre o organismo e o ambiente. Esta função impede que ocorra a invasão de patógenos, agressões químicas e físicas, assim como a perda de água e solutos (Figura 1) (FREINKEL e WOODLEY, 2001; PROKSCH *et al.*, 2008).

Na derme estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos, assim como as estruturas anexas (glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos). Além disso, na derme estão localizadas as células do sistema imune; mastócitos, macrófagos, células T e células dendríticas; principalmente ao redor dos vasos pós-capilares. As células dendríticas, também denominadas de células de Langerhans, são capazes de capturar e processar o antígeno no interior da pele, migrando posteriormente para o linfonodo a fim de fazer a apresentação dos antígenos aos linfócitos T (Figura 1) (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

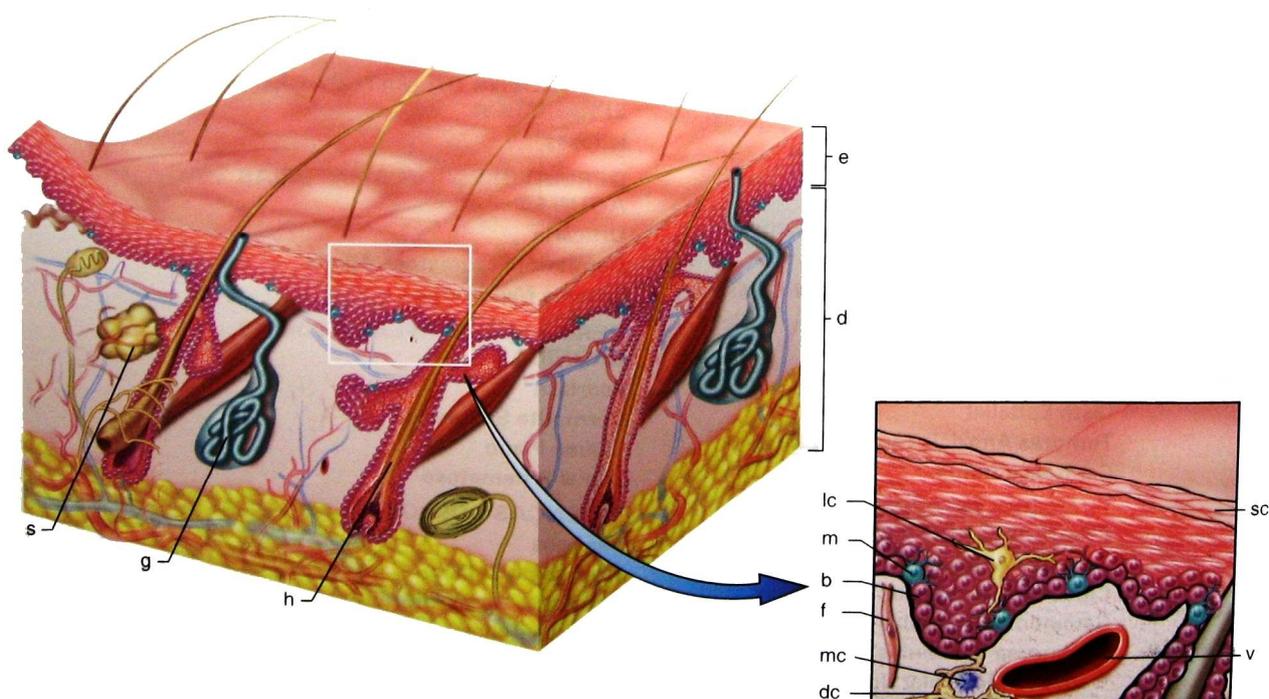


Figura 1 - Esquema de uma seção transversal da pele. Camada epidérmica (e); derme (d); folículos pilosos (h); glândulas sudoríparas (g); glândulas sebáceas (s). A projeção representa a camada epidérmica (e) e a derme subjacente, demonstrando: células basais (b) células escamosas superficiais cornificadas do estrato córneo (sc); melanócitos (m); células de Langerhans (lc); pequenos vasos (v); fibroblastos (f); mastócitos (mc) e dendríticos (dc). Fonte: ROBBINS e COTRAN (2005).

A pele saudável, além de se renovar normalmente como todos os outros órgãos do corpo, tem extraordinária capacidade de auto-regeneração quando sofre lesões. A constante renovação da epiderme ocorre por meio de um processo de mitose controlado, no qual se formam continuamente novos queratinócitos (FREINKEL e WOODLEY, 2001). A proliferação dos queratinócitos é regulada por diferentes marcadores celulares. Esse controle é realizado na fase G₁ do ciclo celular, principalmente por quinases dependentes de ciclinas (cdks); cdk2, cdk4 e cdk6; que são ativadas pela ligação com ciclinas apropriadas. As ciclinas D (D1, D2 e D3) ativam as cdk4/6, enquanto que as ciclinas E e A ativam a cdk2. A atividade das cdks é modulada pelos inibidores das quinases dependentes de ciclinas, Cip1 e Kip1, nos estágios posteriores de diferenciação. Além disso, a proliferação também é regulada por fatores de crescimento e outras substâncias como: vitaminas e seus derivados, ceramidas, neuropeptídeos e neurotransmissores, hormônios esteróides e peptídeos, mediadores inflamatórios, interleucinas, entre outros. Esta via de sinalização estimula o crescimento e parece envolver uma "*up-regulation*" da expressão das ciclinas D, E e A e inibição do Cip1 e Kip1 resultando na progressão do ciclo celular. Quando ocorre hiperproliferação, nos estados patológicos da pele, a queratina 6 (K6) e a queratina 16 (K16) aparecem como marcadores celulares das patologias dermatológicas (GNIADCKI, 1998).

A proliferação celular está presente somente na camada basal da epiderme, enquanto que a diferenciação dos queratinócitos pós-mitose ocorre progressivamente em direção ao estrato córneo. Os queratinócitos presentes em cada camada da epiderme expressam diferentes marcadores bioquímicos do processo de diferenciação. Nos queratinócitos basais são expressos, predominantemente, os marcadores queratina 5 (K5) e 14 (K14). Nas células espinhosas são sintetizados dois marcadores do processo de diferenciação, queratina 1 (K1) e 10 (K10). Nos queratinócitos da camada granular são expressas proteínas associadas com os estágios posteriores da diferenciação como as: profilagrinas, precursor da queratina, filagrina, transglutaminase-I e precursor do envelope de cornificação como a involucrina e loricrina (TU *et al.*, 2004). Além disso, mudanças na concentração de cálcio extracelular também apresentam um papel regulatório importante na diferenciação dos queratinócitos. A elevação da concentração de cálcio leva a mudanças morfológicas características como a formação de desmossomos, estratificação e cornificação (TU *et al.*, 2004; DENNING, 2004).

A pele, além de sua importante função de barreira, é um órgão capacitado à execução de múltiplas funções. Uma das funções é a de exercer proteção imunológica devido a sua grande atividade imunológica, onde atuam intensamente os componentes da imunidade humoral e celular. A pele também desempenha um papel de termorregulação através de seus sistemas de circulação e evaporação. Outra função é a percepção de sensações de toque, dor, calor e frio através de uma complexa e especializada rede nervosa cutânea. A pele é capaz de sintetizar hormônios (ex. dehidrotestosterona) e vitaminas (ex. vitamina D) assim como metabolizar xenobióticos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000).

Além disso, a pele tem papel importante na manutenção e desenvolvimento da defesa contra invasores ou lesões, desencadeando o processo inflamatório que é produzido e mantido pela interação de vários tipos celulares residentes como terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos, além de células que migram para o tecido inflamado como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Desta forma, vários mediadores pró-inflamatórios solúveis são liberados como neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina- CGRP, etc), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, etc), monoaminas (histamina, serotonina, etc) e citocinas (interleucinas, interferons, etc). Estes mediadores por sua vez, através de seus receptores, produzem vários segundos mensageiros que ativam diversas proteínas quinases, como: a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas podem ativar fatores nucleares, como o fator nuclear-kappaB (NF- κ B) e o fator de transcrição AP-1, responsáveis pela transcrição de diversas proteínas (citocinas, enzimas, etc), as quais modulam, mantêm e amplificam a resposta inflamatória (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT *et al.*, 1999).

Como descrito acima, a resposta inflamatória é um processo que o organismo utiliza como um sistema de defesa. A inflamação começa imediatamente após uma lesão com alterações nos vasos sanguíneos que levam a liberação de células e elementos provenientes do sangue resultando na formação do coágulo. O primeiro a atuar no processo inflamatório são as plaquetas, que formam o coágulo e também liberam fatores quimiotáticos e atraem outras plaquetas, leucócitos e fibroblastos para área lesada. A fase inflamatória continua com os leucócitos, especificamente os neutrófilos e macrófagos.

Estes têm o papel de fagocitose, debelar bactérias e retirar os restos celulares. Após esta fase, começa a cicatrização com proliferação celular e formação de tecido (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Na fase da proliferação celular no desenvolvimento do processo inflamatório, os queratinócitos têm papel fundamental. Ocorre notável mudança na morfologia e função destas células, que migram até a camada superficial da região lesada, liberando inúmeras proteínas e enzimas que facilitam a migração e outras funções celulares, reconstituindo a epiderme lesada e a membrana basal. Finalmente, ocorre a formação do tecido de granulação e reconstituição da matriz dérmica, fibroplasia pelos fibroblastos e angiogênese pelas células endoteliais. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais interagem com células ao redor, especificamente através de integrinas para a cicatrização da lesão (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Todas as proteínas geradas durante o processo inflamatório são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos e têm causado grande interesse para descoberta de uma nova geração de antiinflamatórios para tratamento de patologias como artrite reumatóide, asma, esclerose múltipla e psoríase (BHAGWAT *et al.*, 1999). As patologias dermatológicas como dermatites, eczemas e psoríase são lesões cutâneas que apresentam um aspecto muito desconfortável para os pacientes, o que altera significativamente a sua qualidade de vida. Para que haja uma melhora das lesões e da qualidade de vida dos pacientes são, muitas vezes, necessários tratamentos diversos e prolongados. São múltiplos os recursos terapêuticos para estas situações. No entanto, a exigência de terapêutica persistente, prolongada e diversa não contribui para um tratamento eficaz e de boa adesão dos pacientes. Estas dificuldades são acrescidas por ciclos de recorrência que contribuem para o desenvolvimento de situações de ansiedade os quais podem, por sua vez, ser responsáveis por exacerbações das lesões (SOARES, 1995).

Entre essas patologias, a dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica da pele associada com hiperreatividade cutânea a estímulos normalmente inócuos a indivíduos não-atópicos. Vários estudos indicam que a dermatite atópica apresenta etiologia complexa, com ativação de diferentes vias imunológicas e inflamatórias. O fenótipo clínico que caracteriza essa patologia é um produto de complexas interações entre susceptibilidade a genes, o organismo do paciente, defeitos na função de barreira

da pele e respostas imunológicas locais e sistêmicas. Vários estudos têm sido realizados a fim de compreender o papel destes diferentes fatores na patogênese da dermatite atópica, devido à alta incidência desta doença que aparece normalmente durante a infância, mas pode persistir ou aparecer na fase adulta. A prevalência desta patologia é de 10-20% nas crianças e 1-3% nos adultos e está aumentando nas últimas três décadas. De 15-25% dos doentes com problemas cutâneos apresentam dermatite ou eczema (SOARES, 1995; LEUNG *et al.*, 2004).

A dermatite atópica é caracterizada por um intenso prurido, que incomoda muito os pacientes, com uma predileção para acometimento em locais de flexão dos membros superiores e inferiores. É caracterizada pela presença de eritema com edema, vesículas, sinais de eczema nas lesões agudas e liqueificação nas lesões crônicas. A dermatite atópica é frequentemente caracterizada como uma hipersensibilidade contra substâncias ambientais, a qual é associada com aumento da produção de IgE e/ou hiperreatividade não-específica. Como relatado anteriormente, a dermatite é uma doença inflamatória crônica que apresenta uma desregulação complexa do sistema imune. Ocorre a ativação das células T, ativação da função efetora destas células na pele, o que desencadeia os eventos seqüenciais da resposta imune que contribuem para a patogênese da dermatite. Ambas as células T de memória, CD4⁺ e CD8⁺, migram para a pele em resposta ao antígeno linfocitário cutâneo (CLA), induzem a resposta IgE, principalmente via IL-13 (interleucina-13), e prolongam a longevidade dos eosinófilos, principalmente via IL-5. A apoptose desregulada das células T de memória contribui para o surgimento e a progressão da dermatite atópica. A ativação das células T na pele é intensificada pelas citocinas e proteínas da matriz extracelular. As células T ativadas induzem a apoptose dos queratinócitos levando a formação do eczema (AKIDS *et al.*, 2000; WILLIAMS, 2005).

Outra patologia cutânea é a psoríase, a qual é uma desordem recorrente inflamatória na pele, que afeta aproximadamente 2% da população. Anualmente, 1,5 milhões de pacientes nos Estados Unidos vão ao médico devido à psoríase com um gasto estimado entre 1,6-3,2 bilhões de dólares. De acordo com a Fundação Nacional de Psoríase dos Estados Unidos, existem 150.000-260.000 novos casos sendo relatados a cada ano com uma idade média de 28 anos para o aparecimento da doença (DISEPIO *et al.*, 1999; GOTTLIEB, 2005).

A psoríase é caracterizada pela presença de placas vermelhas cobertas por escamas na pele. Os locais comuns de aparecimento das lesões incluem o couro cabeludo, extremidades, parte inferior das costas e genitais. Aproximadamente um terço dos pacientes com psoríase *vulgaris*, a forma mais comum da psoríase, são classificados por apresentarem a doença de forma moderada à severa, classificação realizada com base na área de superfície corporal envolvida ou impacto significativo na saúde psicológica e/ou na saúde física (qualidade de vida). Entre os pacientes com psoríase, 30-40% desenvolvem artrite psoriática que é muito debilitante e apresenta um componente inflamatório. A doença de pele antecede a artrite em uma média de 10 anos em 85% dos pacientes com artrite psoriática (GOTTLIEB, 2005; JEAN *et al.*, 2009).

O exame histológico da placa de psoríase demonstra alterações como o espessamento da epiderme, paraceratose, infiltrado inflamatório linfocítico e vasodilatação. Anteriormente, com base nas características proliferativas, acreditava-se que a doença tinha origem nos queratinócitos e que a inflamação fosse um evento secundário. Mais recentemente tem-se demonstrado que essas alterações proliferativas nos queratinócitos são desencadeadas pelos fenômenos inflamatórios, mediados por linfócitos T. Para que essa ação específica das células T ocorra, são necessários vários passos sequenciais que estão relacionados entre si. O primeiro passo é a ativação das células T devido a uma série de estímulos que começam nos tecidos periféricos, em resposta a uma lesão. Esses estímulos induzem à ativação de células dendríticas, as células apresentadoras de antígeno, que migram para os linfonodos, onde se ligam às células T nativas. A segunda etapa consiste na migração das células T para a pele. As células T, uma vez ativadas, se dividem e se multiplicam, passando a desempenhar o papel de células T efetoras de memória. Assim, as células que foram ativadas por estímulos originários da pele expressam o antígeno linfocitário cutâneo (CLA), os receptores para quimocinas. Essas células interagem progressiva e preferencialmente com vasos da pele que expressem E-selectina, P-selectina, ligantes para quimocinas e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1). Se ocorrer a interação entre os antígenos expressos nas células T e os do endotélio, as células sofrem diapedese e chegam à pele, onde poderão agir como efetoras. A última etapa corresponde a função efetora desempenhada pelas células T. Se houver liberação patológica de citocinas, como o TNF- α , há um aumento na expressão de E-selectina endotelial e ICAM-1 das células T de

memória na pele, onde agirão de maneira efetiva no combate ao estímulo agressor. Essas células T liberam citocinas, que agem de maneira associada a outras citocinas produzidas por outros tipos celulares locais, como os queratinócitos. As citocinas secretadas permitem que o processo se perpetue. Além disso, na psoríase existe o predomínio de ação das células T tipo Th1 (GORDON e MCCORMICK, 2003; ARRUDA *et al.*, 2004; GOTTLIEB, 2005).

Os tratamentos tradicionais para a doença apresentam muitas falhas, incluindo inconveniência (no caso da terapia tópica e fototerapia) e toxicidade, como no caso do tratamento com psoraleno e radiação UVA (PUVA), acitretina, metotrexato e ciclosporina. Além disso, com base nos mecanismos etiopatogênicos da psoríase, iniciou-se o tratamento com uma nova classe de medicamentos, os agentes modificadores da resposta biológica ou, simplesmente, biológicos. Essa classe de medicamentos é representada por drogas protéicas que induzem alterações sistêmicas fenotípicas da resposta imune na psoríase. As estratégias de ação dos diversos agentes biológicos para o controle da psoríase são as seguintes: a) eliminação ou diminuição no número de linfócitos T patogênicos; b) bloqueio das interações célula a célula, o que inibe a ativação celular ou a migração de células T para a pele; c) desvio no sistema imune, o que proporciona uma mudança do predomínio fenotípico de células T tipo 1 na psoríase para uma resposta com predomínio de células tipo 2; d) inativação de citocinas envolvidas na psoríase como o TNF- α , devido a sua participação direta no início da resposta imune e a seus efeitos sobre os queratinócitos, estimulando sua hiperproliferação pela ação do fator de crescimento epidérmico, e sobre o endotélio, onde aumenta a adesão de moléculas e o fator de crescimento do endotélio dos vasos (ARRUDA *et al.*, 2004; GOTTLIEB, 2005).

Exemplos de tratamentos que agem bloqueando a ação do TNF- α são o etanercept, o infliximab e o adalimumab. O infliximab e o adalimumab são anticorpos monoclonais anti-TNF- α . O etanercept é uma fusão protéica Ig-receptor TNF- α . Estes medicamentos biológicos são uma alternativa efetiva para o tratamento da psoríase não responsiva ao tratamento convencional como o metotrexato, ciclosporina e fototerapia. Atualmente, estes fármacos são aceitos como uma opção terapêutica para a psoríase e o conhecimento sobre o uso destas terapias está aumentando na prática diária. Entretanto, apesar destes fármacos já serem utilizados há alguns anos em outras especialidades, como na reumatologia, deve-se ter cautela em relação a sua toxicidade, seja renal,

hepática ou para a medula óssea, além da imunossupressão, teratogenicidade e carcinogênese (ARRUDA *et al.*, 2004; GOTTLIEB, 2005; THIND e ORMEROD, 2008).

O desafio para tratar a psoríase moderada à severa não é na indução da melhora do aspecto das lesões, entretanto o maior problema é devido aos tratamentos disponíveis serem realizados de forma intermitente por apresentarem inconveniências e/ou toxicidade. Portanto, os pacientes apresentam ciclos com a melhora das lesões, apresentando melhora da qualidade de vida, alternado com períodos de doença ativa e baixa qualidade de vida. Dessa forma, há necessidade de longa manutenção efetiva e segura da melhora das lesões nos pacientes com psoríase moderada à severa. Para pacientes com psoríase limitada, que não afeta grandemente a qualidade de vida, é necessário apenas o desenvolvimento de terapias tópicas mais eficazes (GOTTLIEB, 2005). Por isso, a melhor compreensão da alteração da proliferação celular e da natureza inflamatória da psoríase poderá auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta doença (NICKOLOFF *et al.*, 2006).

Portanto, os medicamentos presentes na prática médica atual, como glicocorticóides e imunossupressores, estão muito longe de ser um tratamento ideal para os processos inflamatórios cutâneos crônicos, como a psoríase e a dermatite atópica, devido aos seus efeitos colaterais e/ou toxicidade. Cerca de 79% dos tratamentos para estas patologias falham na primeira opção de tratamento. Além disso, existe baixa aderência ao tratamento devido a pouca aceitação dos medicamentos, quanto às características físicas (cosméticas), seus efeitos adversos e a necessidade de uso contínuo dos mesmos. A academia e a indústria farmacêutica vêm estudando novas possibilidades para tratamento destas patologias. Métodos modernos, como a química combinatória, têm obtido pouco êxito no desenvolvimento de novos medicamentos (DISEPIO *et al.*, 1999; CAUWENBERGH, 2002; MENDONÇA e BURDEN *et al.*, 2003).

1.2. Cininas

Os componentes do sistema cinina-caliceína tem sido investigados desde 1909, quando um componente hipotensivo foi encontrado no sistema urinário, posteriormente sendo identificado como a caliceína tecidual. Em 1949, Rocha-e-Silva e colaboradores isolaram o peptídeo ativo bradiginina (BK) das globulinas plasmáticas tratadas com tripsina ou protease provenientes do veneno da cobra *Bothrops jararaca*. Desde então, as

pesquisas têm demonstrado que as cininas estão envolvidas em uma ampla variedade de fenômenos biológicos. Estes peptídeos contribuem para a regulação da pressão arterial sistêmica através das suas propriedades vasodilatadoras e por sua influência sobre a excreção renal. A BK causa contração da musculatura lisa do intestino, útero e brônquio, regulando o tônus vascular, além de modular o metabolismo da glicose e a pressão arterial. Ainda, induz dor e permeabilidade vascular no processo inflamatório e câncer (BHOOLA *et al.*, 1992; MARCEAU e REGOLI, 2004; COSTA-NETO *et al.*, 2008; MORI *et al.*, 2008).

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos com 9 a 11 aminoácidos, incluindo a BK, calidina, T-cinina e seus metabólitos ativos, as des-Arg-cininas. Esses peptídeos do sistema renina/caliceína são gerados partir da ação das caliceínas sobre um precursor presente no plasma e nos tecidos, o cininogênio. A BK é gerada pela ação da caliceína do plasma sobre o cininogênio de alto peso molecular (APM), ao passo que a calidina é sintetizada pela hidrólise do cininogênio de baixo peso molecular (BPM) pela caliceína tissular. Após a liberação, as cininas são rapidamente metabolizadas por um grupo diferente de peptidases. Há evidências de 4 metalopeptidases que são responsáveis pelo metabolismo da BK: enzima conversora de angiotensina I (ECA, cininase II), aminopeptidase P (APP), endopeptidase neutral 24.11 (NEP, neprilisina) e as carboxipeptidases M e N (CPM, CPN; cininases I). A importância para estas peptidases em regular os níveis das cininas depende da espécie animal, do tipo de fluido biológico e o local de formação tecidual da cininas. Em humanos, os níveis circulantes são primeiramente regulados pela CPN. Entretanto, nas superfícies endoteliais, principalmente no leito vascular pulmonar, a regulação é realizada pela ECA (Figura 2) (REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA *et al.*, 1992; MARCEAU e REGOLI, 2004; MOREAU *et al.*, 2005).

A BK e a calidina, cininas ditas intactas, assim como seus metabólitos, produtos da ação da carboxipeptidase M ou N (cininase I), a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-Lis-BK, exercem seus efeitos biológicos através da ligação aos seus receptores específicos na superfície celular, B₁ e B₂, acoplados à proteína G (Figura 2) (REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA *et al.*, 1992; MARCEAU e REGOLI, 2004).

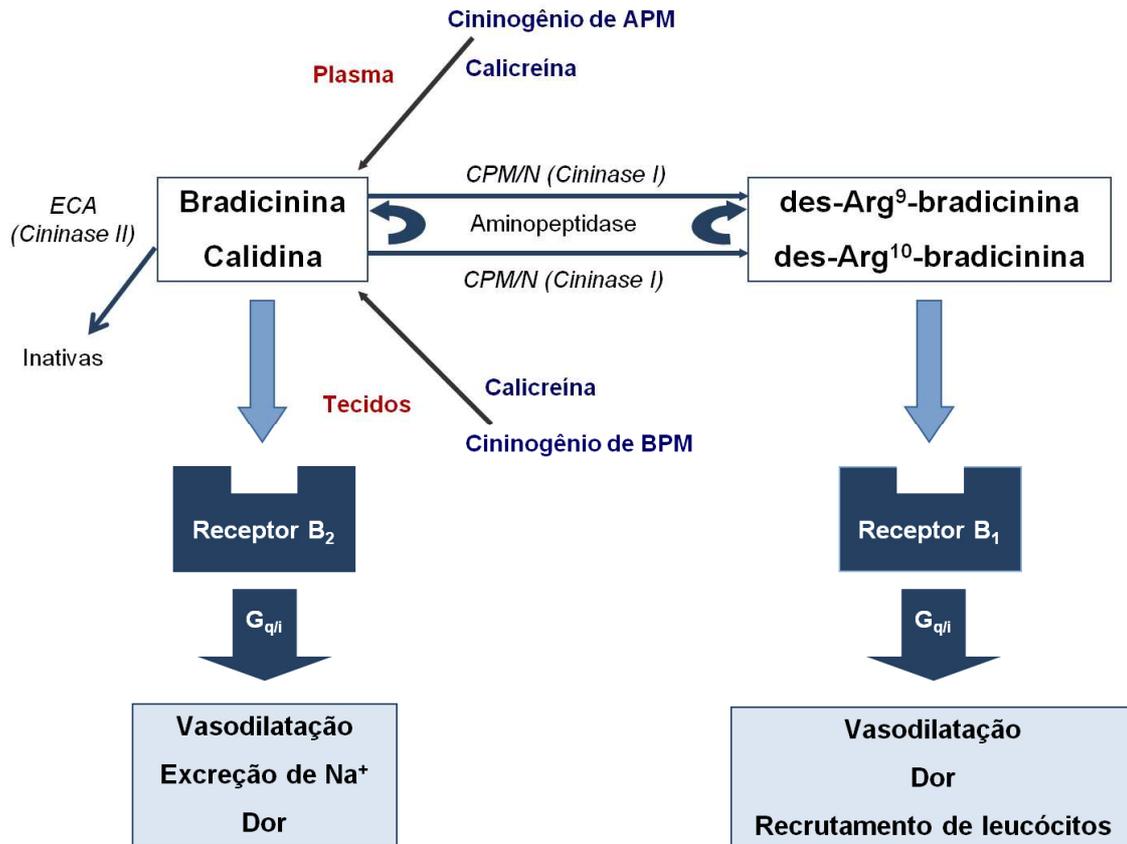


Figura 2 - Síntese dos peptídeos ativos gerados pelo sistema caliceína-cinina e suas interações com os receptores. Bradicینina (BK); cininogênio de alto peso molecular (APM), cininogênio de baixo peso molecular (BPM); carboxipeptidase M ou N (CPM/N); enzima conversora de angiotensina (ECA). Fonte: Adaptado de GOODMAN e GILMAN, 2006.

Os receptores B₂ encontram-se expressos na forma constitutiva e são responsáveis pela maioria das ações fisiológicas das cininas. A BK e a calidina apresentam alta afinidade pelos receptores B₂, enquanto que os receptores B₁ são preferencialmente e seletivamente ativados pelos metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-calidina (Figura 2). Com apenas poucas exceções, os receptores B₁ não são expressos em níveis significativos nos tecidos normais, mas são sintetizados rapidamente em certas condições patológicas tais como sepse, inflamação e estresse oxidativo, indicando um mecanismo adicional na lesão tecidual e na recuperação. Além disso, a indução do receptor B₁ é resultante de uma cascata de eventos que envolvem a interação entre fatores de transcrição, proteínas quinases, citocinas e células inflamatórias (REGOLI *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000; CALIXTO *et al.*, 2004).

A indução do receptor B₁ pode ser vista como um mecanismo para a amplificação do efeito tecidual das cininas, este tipo de receptor é geralmente expresso no mesmo tipo celular que está presente o receptor B₂, recrutando a mesma via de sinalização. Entretanto, o receptor B₁ não sofre dessensibilização após estimulação pelo agonista (MATHIS *et al.*, 1996; MARCEAU e REGOLI, 2004). A regulação dos dois receptores para as cininas difere na seqüência protéica uma vez que o receptor B₁, diferente do receptor B₂ e da maioria dos receptores acoplados à proteína G, não sofre inativação por processo de internalização (ZHOU *et al.*, 2000; LAMB *et al.*, 2001) ou fosforilação induzida pelo ligante (BLAUKAT *et al.*, 1999) (para revisão ver LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

A definição molecular dos receptores das cininas foi iniciada pela clonagem do receptor B₂ em ratos (MCEACHERN *et al.*, 1991) seguida pela do receptor B₁ em humanos (MENKE *et al.*, 1994). O cDNA do receptor B₂ das cininas também já foi clonado em humano (HESS *et al.*, 1992), camundongo (MA *et al.*, 1994; YOKOYAMA *et al.*, 1994), coelho (BACHVAROV *et al.*, 1995), cobaia (FARMER *et al.*, 1998) e cão (HESS *et al.*, 2001). Quando as seqüências são comparadas, os receptores das diferentes espécies apresentam alta homologia com 82-91% entre rato, camundongo e humano (YOKOYAMA *et al.*, 1994). Entre as seqüências dos receptores B₁ e B₂ humano o grau de identidade dos aminoácidos não é muito alta (36% de homologia) (MOREAU *et al.*, 2005).

Apesar da baixa homologia entre os receptores, já foi demonstrado que os genes humanos para os receptores das cininas estão agregados em conjunto no mesmo lócus do cromossomo 14. Em camundongos e ratos os receptores das cininas estão localizados no mesmo cromossomo 12 e 6, respectivamente (MOREAU *et al.*, 2005; ANGERS *et al.*, 2000). Cayla *et al.* (2002) deduziram a localização dos dois genes, B₁ e B₂, e demonstraram que o último exon do gene do receptor B₂ é seguido pelo primeiro exon do gene do receptor B₁. Assim, os dois genes estão posicionados em orientação lateral. Eles estão separados por 12 pb em humano, 9,5 pb no rato e por 7,8 pb em camundongo (BACHAVAROV *et al.*, 1996; YANG e POLGAR, 1996; NI *et al.*, 1998; SCHANSTRA *et al.*, 1998; ANGERS *et al.*, 2000).

O receptor B₁ apresenta 353 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 40,4 kDa. O RNA mensageiro que codifica o receptor B₂ (4 kb) é maior comparado com o do receptor B₁ (1,4 kb) (MOREAU *et al.*, 2005). O gene humano para o receptor B₂ codifica uma proteína de 364 aminoácidos, com massa molecular de

aproximadamente 41 kDa (POWELL *et al.*, 1993). A proteína correspondente a este receptor apresenta regiões para glicosilação e contém sítio para ligação da BK na porção amino terminal da terceira alça extracelular (ABD ALLA *et al.*, 1996). A proteína contém sítios para ligação de proteínas quinases A e C (PKA e PKC), sítios para palmitoilação e diversos sítios para fosforilação (BACHVAROV *et al.*, 1995).

Existem diversas evidências indicando que as cininas são rapidamente geradas após lesão tecidual e parecem modular a maioria dos eventos observados durante os processos inflamatórios incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, migração celular, dor e hiperalgesia (HALL e MORTON, 1997; CALIXTO *et al.*, 2000).

Os dois receptores parecem estar envolvidos com as alterações observadas durante desordens inflamatórias agudas e crônicas. Grande parte dessas conclusões está baseada nos trabalhos que estudam os efeitos dos antagonistas dos receptores utilizados em diversos modelos de inflamação (MARCEAU e BACHVAROV, 1998). Além disso, a geração de animais nocaute para o receptor B₂ (BORKOWSKI *et al.*, 1995) e para o receptor B₁ (PESQUERO *et al.*, 2000) tem auxiliado na definição mais precisa dos papéis patofisiológicos dos receptores das cininas. Posteriormente, a geração dos animais duplo nocaute, com a deleção de ambos os receptores das cininas, conferiram a estes animais resistência ao choque séptico induzido por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (CAYLA *et al.*, 2002).

Utilizando o principal antagonista seletivo para os receptores B₂, Hoe 140, muitos autores têm demonstrado que os receptores B₂ são amplamente responsáveis pela mediação da maioria das respostas inflamatórias agudas (CALIXTO *et al.*, 2000). Complementando os efeitos pró-inflamatórios do receptor B₂, estes se encontram acoplados a múltiplos mecanismos transducionais. A BK ativa os receptores B₂ e estimula a liberação do ácido araquidônico com formação subsequente de prostaglandina E₂ ou I₂, resultando na formação do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Outro componente formado pela ativação dos receptores B₂ também envolvido no processo inflamatório é o óxido nítrico, aumentando o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A ativação de vias alternativas também tem sido verificada, envolvendo a fosforilação de algumas classes de quinases, como tirosina quinase, quinases ativadas por mitógeno, proteína ribossomal S6 quinase e fosfatidilinositol-3-quinase (PYNE *et al.*, 1997; PAN *et al.*, 1999; RITCHIE *et al.*,

1999). Tais mecanismos podem levar à liberação ou mesmo potencialização da ação de outros importantes mediadores inflamatórios como as citocinas (MODÉER *et al.*, 1998) e até mesmo ativação do fator de transcrição NF- κ B (PAN *et al.*, 1998).

A ativação de receptores B₂ acoplados aos mecanismos de transdução pode ser responsável pelo aumento da população de receptores B₁, sugerindo a existência de um processo de balanço entre as duas populações de receptores cininérgicos, durante desordens inflamatórias (CALIXTO *et al.*, 2000). Na verdade, em grande parte das situações inflamatórias após lesão tecidual, estímulo nocivo ou estressante, ocorre rápido aumento na expressão dos receptores B₁ (MARCEAU *et al.*, 1998). Muitos estudos indicam que a interleucina 1 β (IL-1 β) é o indutor mais importante do receptor B₁ tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (MARCEAU *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000).

Complementando as evidências sobre o envolvimento dos receptores B₁ em processos inflamatórios, durante o desencadear da inflamação, uma grande quantidade das cininas sofre a ação de carboxipeptidases, produzindo grandes quantidades dos metabólitos ativos des-Arg⁹-cininas. Essa alta concentração endógena dos agonistas seletivos para o receptor B₁ demonstra que estes possuem papel fundamental também na regulação de expressão dos receptores B₁ (SCHANSTRA *et al.*, 1998). Assim, o aumento na quantidade dos receptores B₁ e de seus ligantes causam aumento importante nos seus efeitos, os quais parecem ser responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória crônica. Dentre os efeitos conhecidos pode-se destacar o aumento na migração de leucócitos e do edema, avaliado com a aplicação de antagonistas seletivos, sendo o principal deles a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e des-Arg¹⁰-Hoe140 (para revisão ler CALIXTO *et al.*, 2000, 2001).

Entretanto, apesar da ação das cininas como mediadores pró-inflamatórios e também responsáveis pela manutenção desse processo ser inquestionável, poucos estudos foram realizados até o momento quanto ao envolvimento nos processos inflamatórios na pele. Em 1999, Schremmer-Danninger e colaboradores identificaram o RNA mensageiro (RNAm) constitutivo para o receptor B₁, para o receptor B₂ e para a calicreína tecidual na pele de indivíduos sadios. Entretanto, o cininogênio aparece somente sob condições patológicas agudas, como no eczema, na psoríase e no basiloma. No mesmo ano, outros autores demonstraram que a administração intradérmica de BK é capaz de causar aumento na permeabilidade vascular de maneira dose-dependente, e

este efeito parece ser mediado em parte pela ativação da enzima 12-lipoxigenase (WANG *et al.*, 1999).

A existência do sistema das cininas na pele humana é um fato comprovado. Poblete e colaboradores (1991) encontraram calicreína tecidual no fundo secretório de glândulas sudoríparas. Além disso, foi mostrada a presença de cininogênio de alto peso molecular no espaço intersticial tecidual na epiderme de cobaias (YAMAMOTO *et al.*, 1987) e também na pele humana (VIDAL *et al.*, 2005). Vários dados indicam que as calicreínas e as cininas contêm substratos que normalmente estão presentes na pele humana contribuindo para o conceito de que as cininas são formadas localmente (VIDAL *et al.*, 2005).

Os dois receptores das cininas parecem contribuir para a resposta vasodilatadora da BK observado em diferentes condições inflamatórias na microvasculatura cutânea (CAO *et al.*, 2002). Esses autores sugerem ainda que os receptores B₂ estão envolvidos na mediação do fluxo sanguíneo, enquanto os receptores B₁ estão envolvidos somente na fase tardia do processo inflamatório cutâneo contribuindo para a duração e a recorrência da condição lesiva.

É importante destacar que outras ações das cininas também sugerem o envolvimento desse sistema em outras etapas dos processos inflamatórios cutâneos, como na proliferação celular. Cheng e colaboradores (2004) demonstraram que a BK, via ativação dos receptores B₂, apresenta efeito mitogênico através da ativação de proteína Gi, causando fosforilação da via da PKC e conseqüente estimulação MEK/MAPK e da expressão de c-fos e c-jun em cultura de queratinócitos da córnea de coelho. Também através de receptores B₂ a BK promove ativação da cascata da p42/p44 MAPK em vários tipos de células humanas, incluindo as da musculatura lisa vascular, endoteliais, PC-12 e linhagem de células tumorais (CHENG *et al.*, 2004).

A expressão de proto-oncogenes celulares, como c-fos, c-jun e c-myc, têm papel importante no controle da proliferação celular. Entretanto, a função precisa da resposta dos genes no controle do crescimento não é claramente entendida, mas parece que muitas delas estão envolvidas com a transição da fase G₀ para G₁ do crescimento celular. Portanto, a compreensão do funcionamento da resposta primária dos genes na regulação do crescimento e diferenciação das células epiteliais tem se tornado uma das maiores áreas de interesse nos últimos anos (COUTANT e RYDER, 1996). Além disso, fatores de

transcrição como o NF- κ B e AP-1 também estão envolvidos na regulação da proliferação celular. A ativação do NF- κ B tem sido detectada somente em células não-proliferativas da camada suprabasal da epiderme humana. De fato, o bloqueio funcional e farmacológico da ativação do NF- κ B produz hiperplasia do epitélio *in vivo*, enquanto que a superexpressão das subunidades p50 e p65 do NF- κ B gera hipoplasia e inibição do crescimento (SEITZ *et al.*, 1998). A expressão de proto-oncogenes e ativação de fatores de transcrição estaria contribuindo para o papel proposto do envolvimento da BK na proliferação celular na pele (CHENG *et al.*, 2004).

O efeito da BK sobre a proliferação celular também foi registrado por Atanassova (2003), que mostrou o envolvimento do receptor B₂ na mediação da resposta estimulatória da BK na proliferação de células germinativas. Vários estudos têm relatado que as cininas podem aumentar a síntese de DNA e a divisão celular em muitos sistemas celulares (BHOOLA *et al.*, 1992). Entretanto, foi demonstrado que agonistas dos receptores B₂ não promovem estímulo da proliferação de queratinócitos (JOHNSON *et al.*, 1992; JUNG *et al.*, 1999; VIDAL *et al.*, 2005) ou induzem fraca resposta quando comparada com a produzida pelo fator de crescimento epidermal (EGF) (COUTANT e RYDER, 1996). Por outro lado, a BK induz à diferenciação de células PC-12 para a superfície de forma similar a produzida pelo fator de crescimento do nervo (KOZLOWSKI *et al.*, 1989). Embora a BK seja um potente mitógeno para fibroblastos (OWEN e VILLERREAL, 1983) existem contradições em relação ao efeito da BK sobre a proliferação de queratinócitos (JOHNSON *et al.*, 1992; TALWAR *et al.*, 1990).

Outros estudos têm descrito o envolvimento das cininas com o processo de diferenciação dos queratinócitos. Vidal *et al.* (2005) afirmam que agonistas dos receptores B₂ não induzem proliferação celular, mas desencadeiam uma via celular em decorrência da rápida expressão de c-Fos, ativação do NF- κ B e moderada síntese de pró-filagrina. Esses mecanismos indicam que o receptor B₂ pode induzir moderada diferenciação dos queratinócitos, sendo que essa pode ser uma resposta altamente relevante na patogênese e/ou progressão de doenças na pele. Recentemente, Matus *et al.* (2008) demonstraram que a ativação do receptor B₁ não estimula a proliferação dos queratinócitos, mas contribui para a diferenciação destes. O receptor B₁ induz a diferenciação por ativar as vias de sinalização relacionadas à tirosina ou por interagir com a família de receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR). Entretanto, Jung *et al.*

(1999) demonstraram a ausência de efeito da BK na proliferação e diferenciação em cultura de queratinócitos humanos devido a ativação transitória da fosfolipase D. Estes autores sugerem que talvez seja necessária a ativação sustentada desta enzima para desencadear a diferenciação dos queratinócitos.

Existem ainda inúmeras questões quanto ao envolvimento das cininas nos processos inflamatórios cutâneos, apesar de existirem fortes indícios de que o sistema pode possuir papel fundamental nas patologias localizadas na pele. O estudo do envolvimento das cininas nesses processos poderá sugerir novos alvos terapêuticos, assim como a melhor compreensão dos processos poderá auxiliar no tratamento das patologias cutâneas, como a psoríase e dermatite atópica. Sendo assim, o presente estudo busca avaliar o papel dos receptores das cininas, B₁ e B₂, em diferentes modelos de inflamação cutânea, bem como os possíveis mecanismos de ação relacionados à sua ativação.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o envolvimento do sistema das cininas no processo inflamatório cutâneo e investigar através de técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular, alguns dos mecanismos que podem estar relacionados com esse efeito.

2.2. Objetivos Específicos

1- Avaliar a participação do sistema das cininas na inflamação neurogênica induzida pela aplicação tópica de capsaicina, na inflamação cutânea induzida pela aplicação de ácido araquidônico (AA) e pela aplicação aguda de 12-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA).

2- Avaliar a participação das cininas no processo inflamatório crônico induzido pela aplicação múltipla de TPA.

3- Verificar o efeito da aplicação de diferentes antagonistas cininérgicos no modelo de edema de orelha induzido por agentes flogísticos em camundongos.

4- Comparar os efeitos dos antagonistas clássicos peptídicos dos receptores das cininas com os novos antagonistas SSR 240612 e FR 173657 (antagonistas não-peptídicos) e R-715 (antagonista peptídico) nos modelos de inflamação cutânea.

5- Estudar a participação das cininas na inflamação cutânea por meio da utilização de animais nocaute para os receptores das cininas.

6- Verificar o papel das cininas nos processos de hiperproliferação cutânea.

7- Avaliar a proliferação celular nos animais nocaute para os receptores das cininas através da quantificação dos níveis da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

8- Avaliar a migração celular no tecido cutâneo por meio de dosagens enzimáticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25-35 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR, em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Os animais foram mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos 1 hora antes do início dos experimentos e foram usados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório (CEEA, 2003), e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) da Universidade Federal do Paraná, sob certificado número 130.

Os animais nocautes foram cedidos pelo Prof. Dr. João Bosco Pesquero do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. A deleção da seqüência de codificação do receptor B₁, B₂ e de ambos os receptores foi obtida e descrita previamente por Pesquero *et al.* (2000), Borkowski *et al.* (1995) e Cayla *et al.* (2007), respectivamente.

3.2. Avaliação do Edema de Orelha

O modelo animal *in vivo* mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema na orelha de camundongos. Sendo assim, este modelo foi empregado com o objetivo de verificar inicialmente a formação do edema e posteriormente o material foi coletado para a análise de outros parâmetros do processo inflamatório (como, por exemplo, a análise histológica). O edema foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos. A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a espessura foi registrada em μm . A espessura da orelha foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Great, MT-04513). Para minimizar variações devido à técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. Os agentes flogísticos foram dissolvidos em 20 μL de acetona e aplicados na orelha direita dos camundongos (OTUKI *et al.*, 2005).

3.3. Avaliação da Participação das Cininas em Modelos de Inflamação Cutânea

Com o objetivo de verificar o papel das cininas em diferentes processos inflamatórios cutâneos foram utilizados diferentes agentes para indução da inflamação cutânea, para abranger mecanismos inflamatórios diferentes, e foram avaliados conhecidos antagonistas seletivos e animais nocaute para os receptores das cininas nestes modelos.

A. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é a substância ativa responsável pelo efeito pungente e irritante das pimentas (páprica, pimenta vermelha e *Capsicum annuum* L.) e a aplicação tópica de capsaicina produz reação inflamatória de origem neurogênica (JANCSÓ *et al.*, 1981). O Hoe 140 (antagonista peptídico para o receptor B₂; 0,1 - 100 nmol/kg), des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (antagonista peptídico para o receptor B₁; 10 - 1000 nmol/kg) e R-715 (antagonista peptídico para o receptor B₁; 10 - 100 nmol/kg) foram administrados intraperitonealmente (i.p.) 15 min antes da aplicação de capsaicina (200 µg/orelha) na orelha direita. O FR 173657 (antagonista não-peptídico para o receptor B₂; 0,03 - 0,3 mg/orelha), SSR 240612 (antagonista não-peptídico para o receptor B₁, 0,01 - 0,3 mg/orelha) e a associação dos antagonistas FR 173657 e SSR 240612 (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente 10 minutos antes da aplicação de capsaicina. Além disso, foi avaliada a resposta dos animais nocaute, tanto para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) como para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e animais nocaute para ambos os receptores (B₁B₂^{-/-}) no edema de orelha induzido pela capsaicina. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 30 min após a aplicação do agente flogístico (GABOR e RAZGA, 1989).

B. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (AA)

A aplicação tópica de AA promove resposta inflamatória rápida, caracterizada por intenso eritema e edema (YOUNG *et al.*, 1983). Os três principais mediadores deste processo inflamatório são os metabólitos do ácido araquidônico PGE₂ e os leucotrienos C₄ e D₄ (LTC₄/LTD₄) (CHANG *et al.*, 1986). O Hoe 140, R-715 e o Hoe 140 plus R-715 (30 nmol/kg) foram administrados i.p. 15 min antes da aplicação do AA (2 mg/orelha). Além disso, foram avaliados os antagonistas SSR 240612 (0,1 mg/orelha; antagonista não-peptídico dos receptores B₁), FR 173657 (0,1 mg/orelha; antagonista não-peptídico

dos receptores B₂) e associação dos antagonistas (SSR 240612 + FR 173657; 0,1 mg/orelha) aplicados topicamente, 10 min antes da aplicação do AA. Também foi avaliada a resposta dos animais nocautes, tanto para o receptor B₁ como para o receptor B₂ e duplo nocaute nesse modelo. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 1 h após a aplicação do agente flogístico (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987).

C. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Os ésteres de forbol, como o TPA presente no óleo de cróton, induzem inflamação na pele e respostas hiperproliferativas nos animais, o que em muitos aspectos se assemelha com os sinais das doenças de pele como a psoríase (GÁBOR, 2000). O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita de camundongos. Antagonistas dos receptores B₁ das cininas (des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK; 1000 nmol/kg) e dos receptores B₂ (Hoe 140; 100 nmol/kg) foram administrados por via intraperitoneal, 15 min antes da aplicação do TPA. Os antagonistas não peptídicos, SSR 240612 (0,1 mg/orelha) e FR 173657 (0,1 mg/orelha), foram aplicados topicamente 5 min depois da aplicação do TPA. O aumento da espessura da orelha foi avaliado 6 h após a aplicação do agente flogístico (DE YOUNG *et al.*, 1989). Também foi avaliada a resposta dos animais nocautes para o receptor B₁, para o receptor B₂ e duplo nocaute no edema de orelha induzido pelo TPA.

3.4. Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de TPA

Para avaliar um possível efeito curativo da inibição das cininas em um processo inflamatório pré-estabelecido foi utilizado um modelo de inflamação crônica. O processo inflamatório crônico foi induzido nos animais nocaute, para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), para o receptor B₂ (B₂^{-/-}), duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) e em animais selvagem (+/+) pela aplicação de 20 µl de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Ainda, em outro grupo de animais controle, o glicocorticóide dexametasona (utilizado como controle positivo, 0,1 mg/orelha), dissolvido em 20 µl de acetona, foi aplicado topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do experimento (STANLEY *et al.*, 1991). Além disso, foi avaliado o efeito dos antagonistas não-peptídicos no mesmo modelo. Os antagonistas não-peptídicos FR 173657 (0,1 mg/orelha), SSR 240612 (0,1 mg/orelha) e a

associação destes antagonistas (SSR + FR; 0,1 mg/orelha) foram dissolvidos em 20 µL de acetona e posteriormente aplicados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do experimento, sendo o edema avaliado diariamente. Após a avaliação do edema, no nono dia, foram coletadas e armazenadas amostras (círculos de 6 mm) das orelhas dos camundongos para serem submetidas à avaliação histológica, avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase e n-acetil-β-D-glucosaminidase, bem como para determinação dos níveis de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

3.5. Medida da Atividade Enzimática da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando a metodologia de Bradley *et al.* (1982) modificada por De Young *et al.* (1989). As amostras (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 minutos. Duplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foi adicionado 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5.4), 85 µL de PBS 0,22 M (pH 5.4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %. A placa foi posteriormente incubada a 37°C por 3 minutos e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3.0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mili densidade ótica por amostra (mDO/biópsia).

3.6. Medida da Atividade Enzimática da n-acetil-β-D Glucosaminidase (NAG)

A avaliação da atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares e foi realizada a partir de amostras de orelhas de camundongos submetidas à aplicação repetida de TPA no modelo de inflamação cutânea

crônica, seguindo a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras do tecido (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e foram adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de p-nitrofenil-acetamida-µ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. A seguir a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorvância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/biópsia.

3.7. Análise Histológica

Amostras de orelhas coletadas de camundongos submetidos ao modelo agudo e crônico de edema de orelha induzido pela aplicação de TPA foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) por um período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até o início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm que foram corados com hematoxilina e eosina (RECIO *et al.*, 2000). A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200x. Além disso, foi determinada a espessura da epiderme com lente ocular graduada. A espessura epidermal foi considerada como a distância da camada basal até o extrato córneo da epiderme. Foram retiradas 3-5 fotos de cortes histológicos diferentes para cada amostra e foi realizada a medida da espessura, de forma randomizada em 6 pontos diferentes, de cada fotografia utilizando o programa Photoshop. O valor da média foi calculado para cada amostra (DEMERJIAN *et al.*, 2006).

3.8. Extração de proteínas citosólicas e nucleares

Os tecidos foram preparados como descrito por Sabourin e colaboradores (2002) com algumas modificações. As amostras de tecido das orelhas dos camundongos foram congeladas e armazenadas em freezer a -70° C até o momento do uso. Os extratos protéicos foram preparados como descrito por Medeiros e colaboradores (2007) com algumas modificações. As biópsias foram colocadas em tampão de lise gelado (HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na_3VO_4 , 1,5 μ g/ml de inibidor de tripsina, 7 μ g/ml de pepstatina A, 5 μ g/ml de leupeptina e 10 μ g/ml de aprotinina) e homogeneizados por 20 s, duas vezes. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min e o sobrenadante foi separado como a fração citosólica das preparações. O precipitado foi re-suspenso em tampão com alta concentração de sal (HEPES 20 mM (pH 7,9), contendo: 420 mM de NaCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de EDTA, 25% v/v de glicerol, 0,5 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 1,5 μ g/ml de inibidor de tripsina, 7 μ g/ml de pepstatina A, 5 μ g/ml de leupeptina e 10 μ g/ml de aprotinina) e incubado sob agitação constante a 4° C por 30 min. O homogenato foi centrifugado a 10000 x g por 30 min, sendo o sobrenadante coletado como a fração nuclear das preparações. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (*Bio-Rad Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As frações citosólica e nuclear foram armazenadas em freezer a -70° C até o momento do uso.

3.9. Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de *Western Blot*

Com o objetivo de avaliar a proliferação celular, após a aplicação múltipla de TPA, foi utilizada a técnica de *western blot* para avaliar o padrão de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) na pele de camundongos. Para tal, amostras (círculos de 6 mm de diâmetro de tecido da orelha dos camundongos) foram coletadas no dia 9 após o tratamento crônico com a aplicação múltipla de TPA para avaliação dos níveis de PCNA. A fração nuclear dos extratos de biópsias de orelhas, obtida como descrito anteriormente foi submetida à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida (12,5%), sendo logo depois transferida para uma membrana de polivinilideno difluorido (PVDF). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em

solução de leite desnatado (5%) e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para PCNA (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.10. Avaliação dos níveis da proteína PCNA por Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada pelo método indireto (revelação do complexo antígeno-anticorpo). As orelhas foram emblocadas previamente em parafina e cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm. Os cortes foram desparafinados em xilol (três banhos com duração de dez minutos cada) e reidratados em concentrações de alcoóis decrescentes 100%, 95%, 80% e 70% (banhos com duração de cinco minutos cada) e banho em tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Após o banho a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio em metanol a 3% por 10 min. Posteriormente, foi realizada a inibição dos sítios antigênicos inespecíficos através da incubação das lâminas com soro de albumina bovina (PBS/BSA 1%) (30 minutos) em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida foi feita incubação por 2 horas em câmara úmida com anticorpo primário anti-PCNA na temperatura ambiente, na proporção de 1:50 em solução de PBS/BSA a 1%. Neste momento foi selecionada uma lâmina para controle negativo que recebeu anticorpo isotípico (*purified mouse IgG₁ immunoglobulin isotype*), omitindo-se o anticorpo primário. Após um banho de PBS/BSA a 1% e três banhos de PBS, todos os cortes foram incubados com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 h em câmara úmida e a temperatura ambiente, na proporção de 1:100 em solução de PBS/BSA 1%. Em seguida, foram feitos três banhos com PBS e incubação dos cortes com o cromógeno diaminobenzidina (Kit Substrato DAB, 10 min). O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina por 5 min, desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (ATHAR *et al.*, 2004). Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada. A marcação foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200x e 400x. Além disso, foi realizada a quantificação da marcação da proteína PCNA em 5 diferentes áreas em aumento de 400x. Para esta análise, foram retiradas 5 fotos, de

forma randomizada, de cada 3-5 cortes histológicos distintos, corados com o cromógeno diaminobenzidina e não contra-corados com hematoxilina, para cada amostra de orelha. A quantificação foi realizada em pixels utilizando o programa Image J[®].

3.11. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DI_{50} (dose do antagonista necessária para reduzir em 50% as respostas inflamatórias em relação ao grupo controle), que são representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman Keuls. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

3.12. Drogas e Reagentes

As drogas e reagentes usados foram: 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico, dexametasona, hexadeciltrimetilamônio (HTAB), Tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, Hoe 140, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ditiotreitól (DTT), inibidor de tripsina, pepstatina A, aprotinina, leupeptina, ortovanadato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 20, ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n'-2'-etanossulfônico (HEPES), glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Chemical Co[®], EUA); capsaicina (Purifarma[®], Brasil); cloreto de sódio, fluoreto de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Tris-HCl, cloreto de magnésio, fosfato de sódio (Na_2HPO_4), glicina, dimetilformamida, acetona, formaldeído, ácido acético glacial (Merck Biosciences[®], Alemanha); formaldeído, eosina, hematoxilina, álcool absoluto, xilol, peróxido de hidrogênio, metanol, floxina B, propilenoglicol (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil); anticorpo policlonal anti-PCNA, anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP - *horseradish peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology[®], EUA); kit substrato DAB para peroxidase, anticorpo isotípico IgG₁ (BD Biosciences Pharmigen[®], EUA). O antagonista R-715 foi doado pelo Dr. Domenico Regoli. Os antagonistas SSR 240612 e FR 173657 foram doados pelas Indústrias Sanofi-Aventis[®] (Deutschland, Alemanha) e Astellas[®] - Japão, respectivamente. As soluções estoques dos antagonistas peptídicos foram preparadas em

salina em tubos plásticos siliconizados, mantidas a -18°C , as quais foram diluídas a concentração desejada somente antes do uso. Os antagonistas FR 173657 e SSR 240612, aplicados topicamente, foram pré-solubilizado em 2% de dimetilsufóxido (DMSO), 15% de propilenoglicol e 33% de etanol, sendo posteriormente diluídos em 50% do volume final de acetona.

4 RESULTADOS

4.1. Efeito das Cininas em Modelos de Inflamação Cutânea

4.1.1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

Para estabelecer a melhor dose de capsaicina capaz de induzir o edema de orelha foi feita a curva de padronização da capsaicina apresentada na Figura 3.

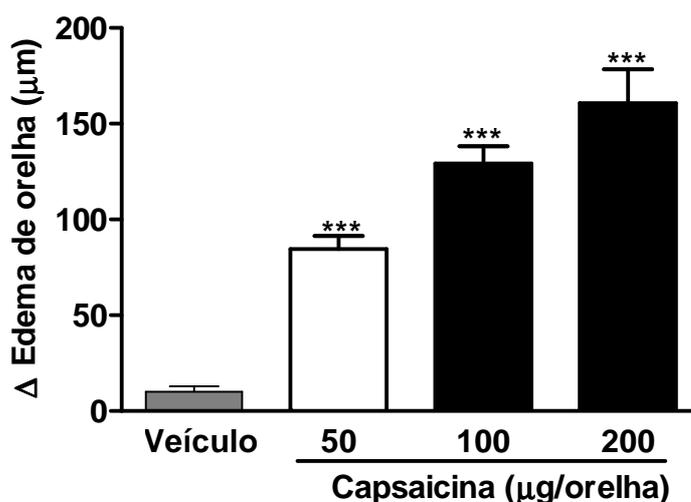


Figura 3 - Curva de padronização da capsaicina. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. para 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo veículo. Difere significativamente do grupo veículo, *** $P < 0,001$.

A Figura 4 demonstra o efeito dos antagonistas dos receptores B_1 e B_2 da BK no edema de orelha induzido pela capsaicina (200 $\mu\text{g}/\text{orelha}$). O Hoe 140 (antagonista dos receptores B_2 ; 0,1; 1,0; 10; 30 e 100 nmol/kg); a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (antagonista seletivo de receptores B_1 ; 10, 100 e 1000 nmol/kg) e o R-715 (antagonista peptídico dos receptores B_1 ; 10, 30 e 100 nmol/kg) foram administrados i.p., 15 min antes da aplicação de capsaicina na orelha direita. A espessura das orelhas foi medida antes e 30 min após a indução da inflamação (GABOR e RAZGA, 1989). Esses antagonistas inibiram de forma significativa a formação do edema de orelha induzido pela capsaicina. O valor da DI_{50} calculada para o Hoe 140 foi de 23,83 (9,14 - 62,14) nmol/kg e a inibição observada foi de $61 \pm 5\%$ na dose de 100 nmol/kg . A inibição obtida para a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK foi de $56 \pm 16\%$ na dose de 1000 nmol/kg e para o R-715 foi de $65 \pm 10\%$ na dose de 100 nmol/kg .

Entretanto, quando o R-715 (0,1 mg/orelha) foi aplicado topicamente, 10 min antes da aplicação de capsaicina (200 µg/orelha), este antagonista não foi capaz de inibir o edema.

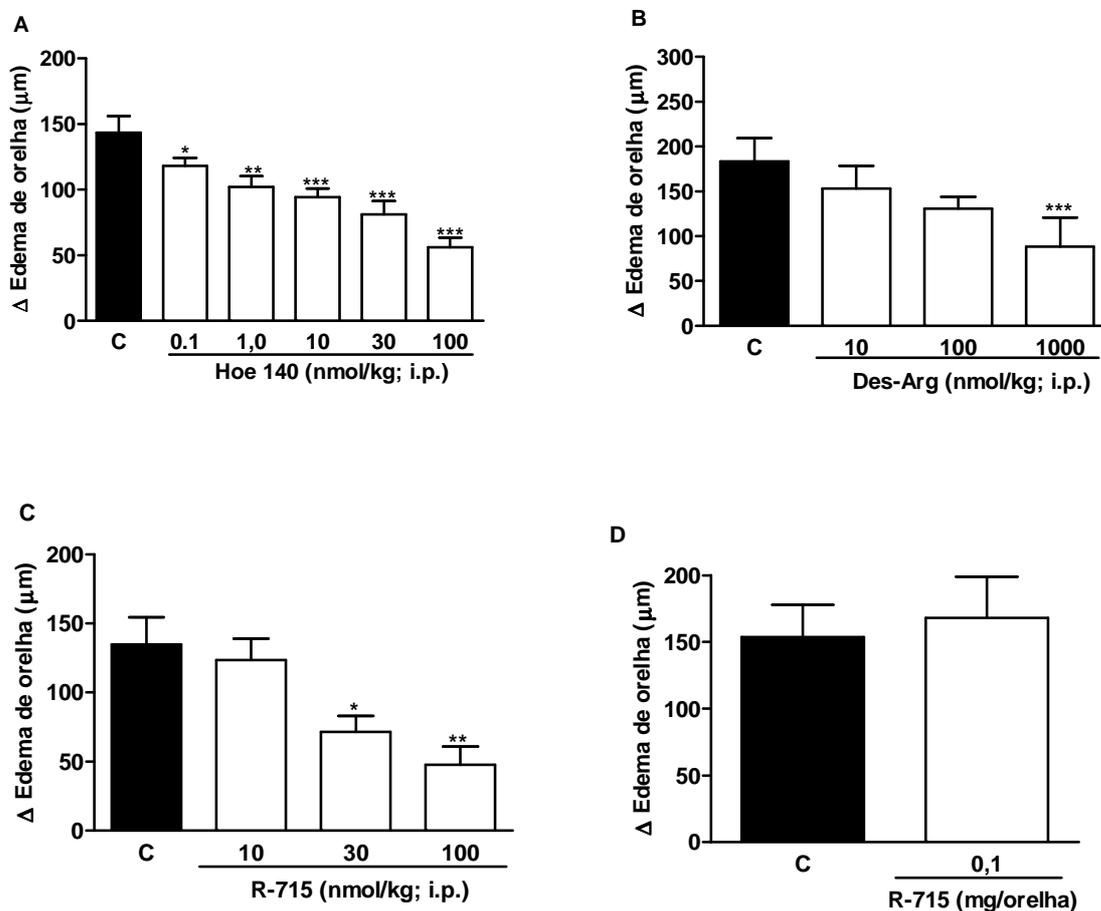


Figura 4 - Efeito dos antagonistas peptídicos no edema de orelha induzido pela capsaicina. Os antagonistas peptídicos foram administrados i.p.: Hoe 140 (0,1 a 100 nmol/kg) **(A)**, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (10 a 1000 nmol/kg) **(B)** e R-715 (10 a 100 nmol/kg) **(C)** e topicamente: R-715 (0,1 mg/orelha) **(D)** no edema de orelha induzido pela capsaicina (200 µg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

Além disso, foi avaliado o efeito do SSR 240612 (antagonista não-peptídico do receptor B₁; 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/orelha), do FR 173657 (antagonista não-peptídico do receptor B₂; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/orelha) e da associação dos antagonistas (SSR + FR, 0,1 mg/orelha) aplicados topicamente, 10 min antes da aplicação de capsaicina. O SSR 240612 e o FR 173657 inibiram de forma significativa o edema de orelha induzido pela capsaicina. A DI₅₀ calculada para o SSR 240612 foi de 0,23 (0,15 - 0,36) mg/orelha e a inibição observada foi de 56 ± 3% na dose de 0,3 mg/orelha. A inibição observada para o FR 173657 foi de 48 ± 8% na dose de 0,1 mg/orelha. O co-tratamento com os antagonistas FR 173657 e SSR 240612 não causou aumento da inibição (52 ± 4%) do edema quando comparado com os resultados obtidos com a aplicação individual de cada antagonista (Figura 5).

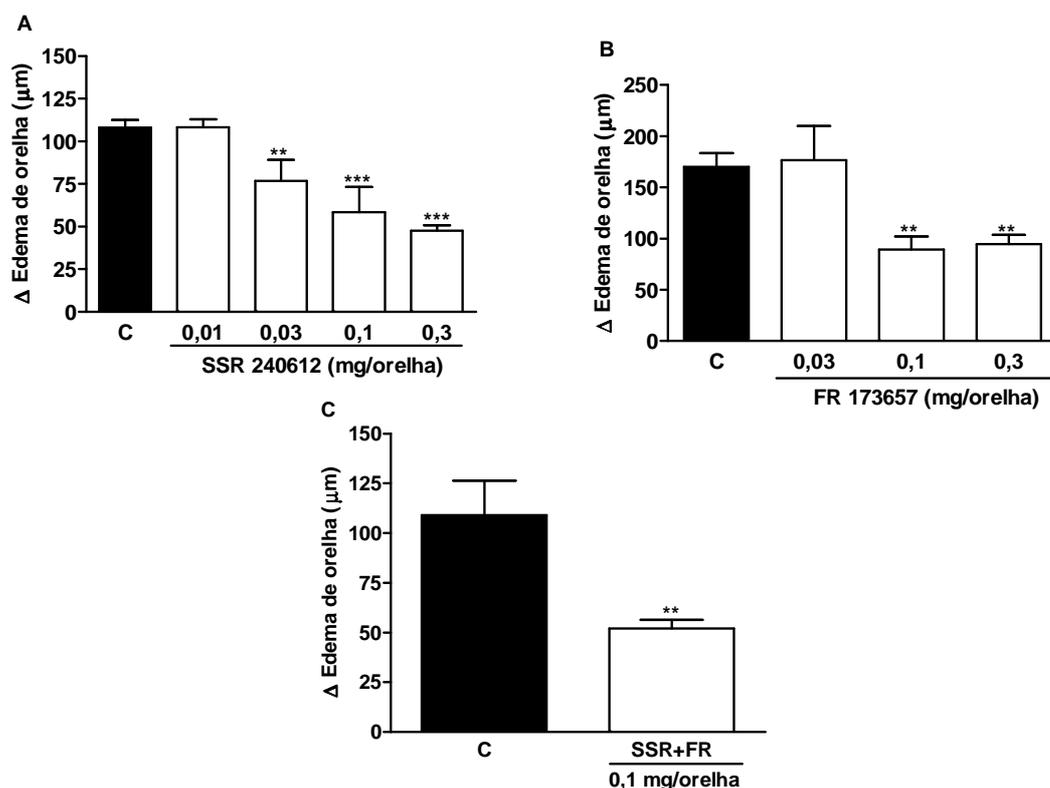


Figura 5 - Efeito dos antagonistas não-peptídicos aplicados topicamente no edema de orelha induzido pela capsaicina. Os antagonistas SSR 240612 (0,01 a 0,3 mg/orelha) **(A)**, FR 173657 (0,03 a 0,3 mg/orelha) **(B)** e associação dos antagonistas SSR 240612 e FR 173657 (0,1 mg/orelha) **(C)** foram avaliados no edema de orelha induzido pela capsaicina (200 μg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01 e ***P<0,001.

A Figura 6 mostra a resposta dos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B_1 ($B_1^{-/-}$), nocaute para o receptor B_2 ($B_2^{-/-}$) e duplo nocaute B_1B_2 ($B_1B_2^{-/-}$) após a aplicação de capsaicina (200 μ g/orelha) na orelha direita. Nos animais nocaute, tanto para receptores B_1 quanto para receptores B_2 das cininas, não foi observado redução do edema induzido pela capsaicina (Figura 6A). Entretanto, nos animais nocaute para ambos os receptores ocorreu redução de $42 \pm 7\%$ no edema induzido pela capsaicina. Para confirmar esse resultado, foi feita a avaliação dos antagonistas seletivos para os receptores das cininas nos animais nocaute, ou seja, o Hoe 140 (antagonista dos receptores B_2 , 30 nmol/kg) foi administrado i.p. nos animais nocaute para o receptor B_1 ($B_1^{-/-}$) e o R-715 (30 nmol/kg) foi administrado i.p. nos animais nocaute para o receptor B_2 ($B_2^{-/-}$), 15 min antes da aplicação de capsaicina (200 μ g/orelha). Os dois antagonistas inibiram de forma significativa o edema de orelha induzido pela capsaicina e as inibições observadas foram de $49 \pm 14\%$ e $36 \pm 13\%$ na dose de 30 nmol/kg, respectivamente para o Hoe 140 e R-715 (Figura 6B). Quando o R-715 (30 nmol/kg, i.p.) foi injetado nos animais nocaute para o receptor B_1 ($B_1^{-/-}$) e o Hoe 140 (30 nmol/kg, i.p.) nos animais nocaute para o receptor B_2 ($B_2^{-/-}$), 15 min antes da aplicação de capsaicina (200 μ g/orelha), os antagonistas falharam em inibir o edema de orelha induzido pela capsaicina (Figura 6C).

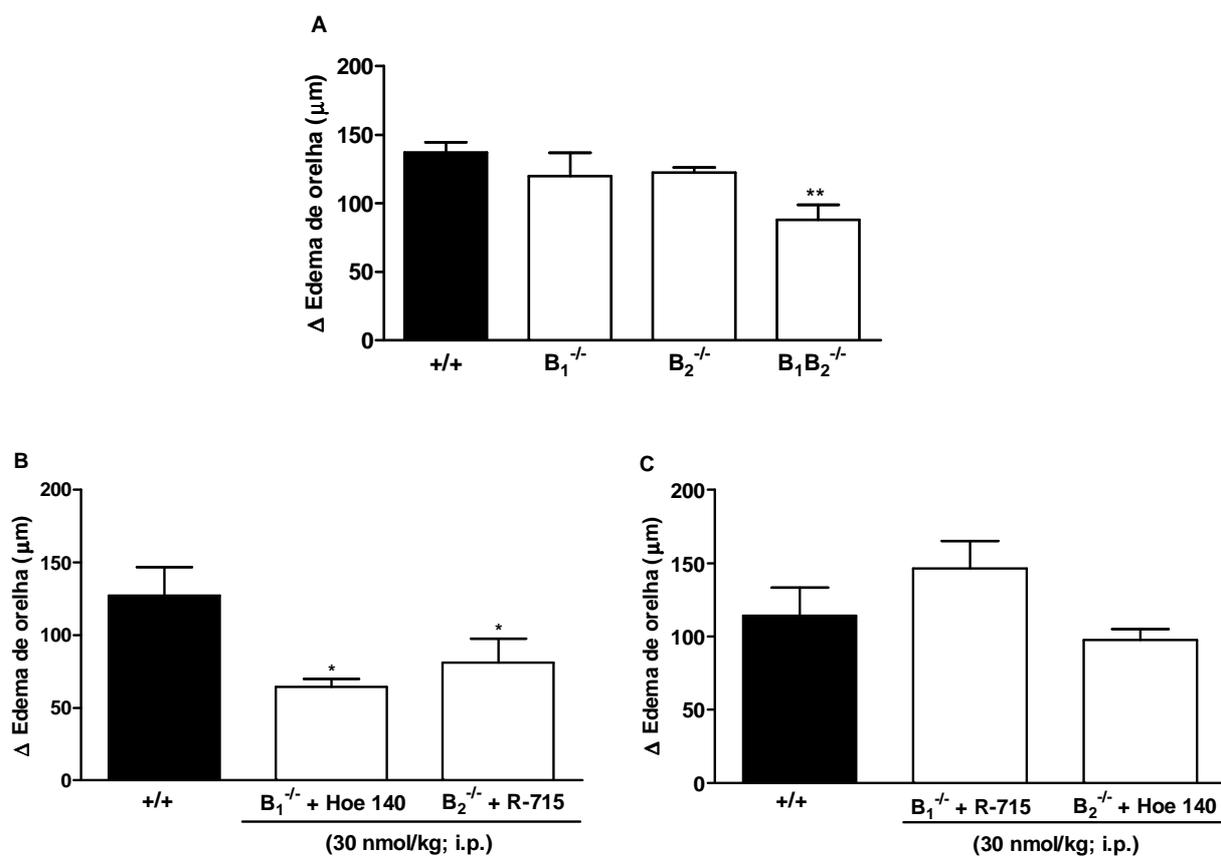


Figura 6 - Avaliação da resposta dos animais nocaute no edema de orelha induzido pela capsaicina. Resposta dos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) **(A)**; efeito do Hoe 140 (30 nmol/kg) administrado i.p. nos animais nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) e do R-715 (30 nmol/kg) administrado i.p. nos animais nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) **(B)** e efeito do tratamento com R-715 (30 nmol/kg, i.p.) nos animais nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) e com Hoe 140 (30 nmol/kg, i.p.) nos animais nocautes para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) **(C)** no modelo de edema de orelha induzido pela capsaicina (200 μg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. para 2-4 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo selvagem, *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (AA)

O Hoe 140 (antagonista dos receptores B₂; 30 nmol/kg) e o R-715 (antagonista peptídico dos receptores B₁; 30 nmol/kg) foram administrados i.p., 15 min antes da aplicação de AA (2 mg/orelha) na orelha direita. Esses antagonistas não foram capazes de inibir a formação do edema de orelha induzido pelo AA. Entretanto, os antagonistas inibiram de forma significativa o edema quando foram aplicados conjuntamente (Hoe 140 mais R-715, 30 nmol/kg). A inibição observada foi de $36 \pm 4\%$ (Figura 7A). O SSR 240612 (antagonista não-peptídico do receptor B₁ da BK; 0,1 mg/orelha) e o FR 173657 (antagonista não-peptídico do receptor B₂ da BK; 0,1 mg/orelha) aplicados topicamente, 10 min antes da aplicação do AA, foram capazes de inibir de forma significativa o edema. A inibição observada para o SSR 240612 e FR 173657 foi de: $23 \pm 10\%$ e $27 \pm 6\%$, respectivamente. Além disso, a associação do SSR 240612 e do FR 173657 (SSR 240612 mais FR 173657; 0,1 mg/orelha) inibiu de forma significativa a inflamação cutânea induzida pelo AA. A inibição observada para este feito foi de $34 \pm 12\%$ (Figura 7B). A Figura 7C, mostra a resposta dos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) após a aplicação de AA (2 mg/orelha) na orelha direita. Em nenhum dos animais nocaute, tanto para receptores B₁ quanto para receptores B₂ das cininas foi observada redução do edema induzido pelo ácido araquidônico. Entretanto, nos animais nocaute para ambos os receptores ocorreu redução de $17 \pm 3\%$ no edema induzido pelo AA.

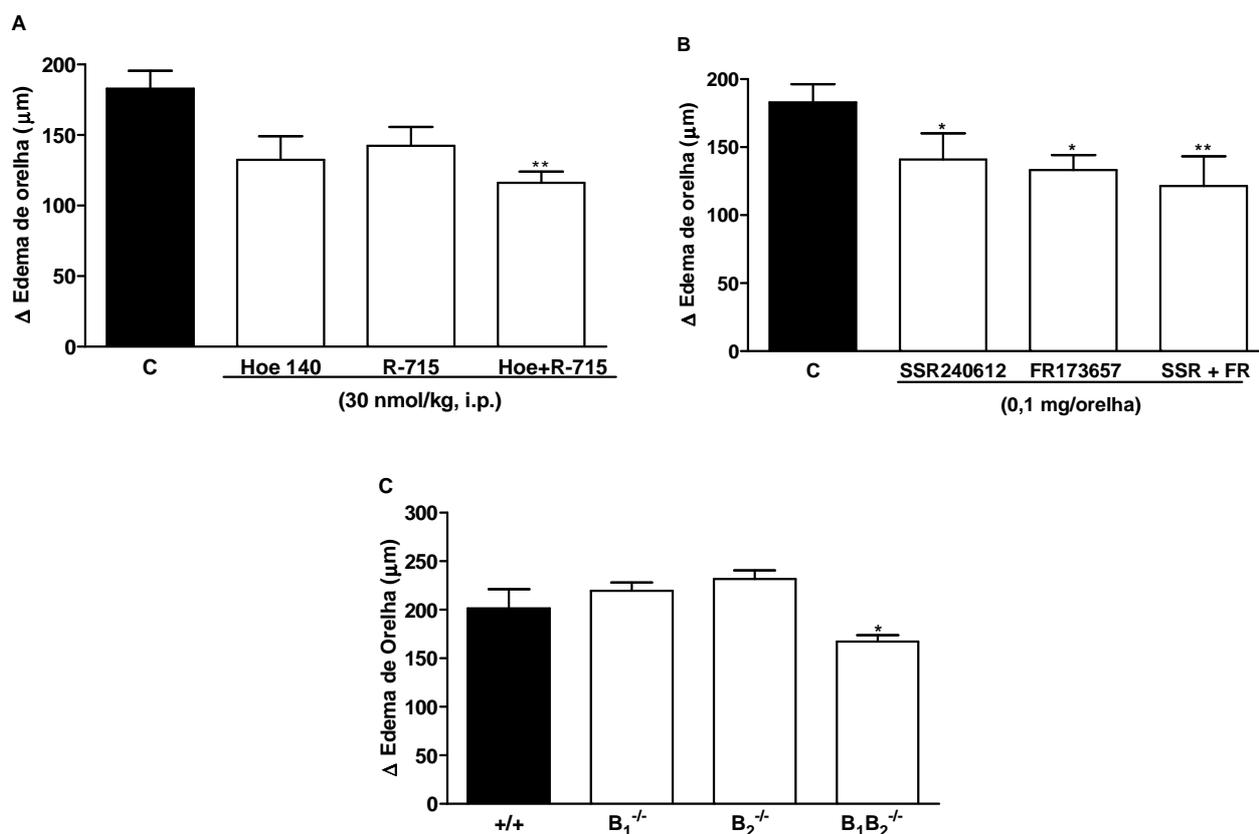


Figura 7 - Avaliação dos antagonistas e dos animais nocaute para os receptores das cininas no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico. Efeito do Hoe 140 (30 nmol/kg), R-715 (30 nmol/kg) e Hoe 140 mais R-715 administrados i.p. (**A**); efeito do SSR 240612 (0,1 mg/orelha), FR 173657 (0,1 mg/orelha) e SSR + FR (0,1 mg/orelha) (**B**) e resposta dos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) (**C**) no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (2 mg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C) ou grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

A administração por via intraperitoneal do antagonista dos receptores B₂ das cininas, Hoe 140 (100 nmol/kg) não foi eficaz em inibir o edema mediado pelo TPA (2,5 μg/orelha) (Figura 8A). Resultado semelhante foi obtido com a administração por via intraperitoneal do antagonista dos receptores B₁ das cininas, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1000 nmol/kg), que também não foi capaz de inibir o edema mediado pelo TPA (Figura 8B). Os antagonistas não-peptídicos, SSR 240612 (0,1 mg/orelha) e FR 173657 (0,1 mg/orelha)

aplicados topicamente 5 min depois do TPA, também não alteraram o edema (Figura 8C e D). Da mesma maneira, os animais selvagem, nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e os animais duplo nocaute também não apresentaram alteração do edema induzido pela aplicação aguda de TPA (Figura 9A). Essa resposta, mostrada no painel A da Figura 9 é confirmada pelo resultado mostrado no painel B, que demonstra o peso das orelhas ao final da aplicação aguda de TPA. A Figura 10 mostra fotos representativas das orelhas dos animais após o estímulo com o TPA e pode-se verificar que em todos os animais selvagem e nocaute para os receptores das cininas não apresentaram redução do edema. Além disso, as amostras de tecido das orelhas dos animais foram retiradas para análise histológica. A análise histológica das amostras coletadas 6 h após a aplicação de TPA confirma o resultado mostrado nas figuras anteriores demonstrando que não houve alteração do edema (Figura 11). A análise histológica das amostras coletadas 24 h após o estímulo agudo com o TPA também confirma que não houve alteração do edema. Entretanto a análise histológica de 24 h mostra que houve redução da migração de neutrófilos nos animais nocaute para o receptor B₁^{-/-}, B₂^{-/-} e duplo nocaute após a aplicação de TPA (Figura 12). Foi realizada a análise histológica em dois tempos distintos devido o edema de orelha induzido pelo TPA alcançar uma formação máxima em 4-6 h e a migração de neutrófilos para a derme apresentar um pico máximo em 24 h após a aplicação de TPA (GÁBOR, 2000). Posteriormente, foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), sendo esta um marcador enzimático indireto da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado (LLORET e MORENO, 1995). A aplicação tópica do TPA aumentou de forma intensa a atividade da MPO nos animais selvagem. Os animais nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e duplo nocaute apresentaram redução da atividade da enzima avaliada com diminuição significativa de 31 ± 5%, 44 ± 12% e 24 ± 10%; respectivamente (Figura 13). Além disso, a quantificação da infiltração de neutrófilos na análise histológica de 24 h confirma a diminuição significativa no número de neutrófilos nos cortes histológicos dos animais nocaute para os receptores das cininas. A redução na quantificação de neutrófilos foi de 24 ± 9%, 39 ± 8% e 24 ± 7% para os animais nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e duplo nocaute, respectivamente (Figura 14).

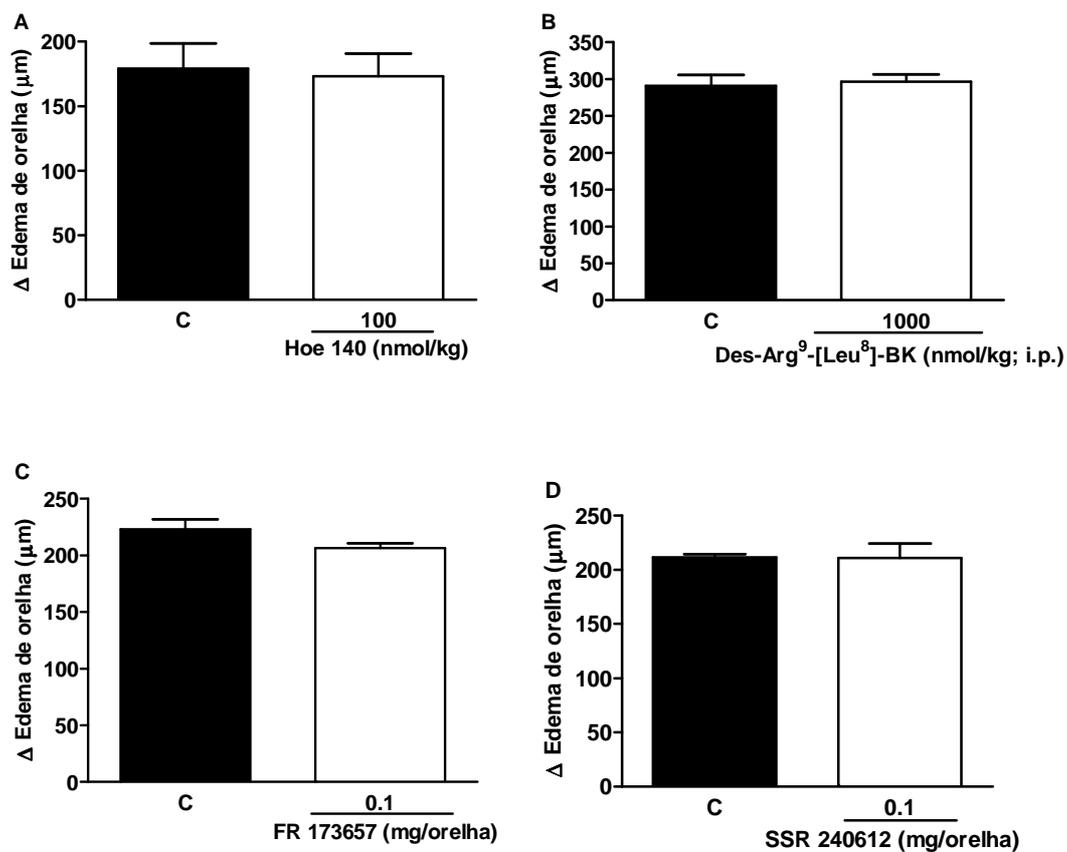


Figura 8 - Avaliação dos antagonistas para os receptores das cininas no edema de orelha induzido pelo TPA. (A) Efeito do Hoe 140 (antagonista seletivo de receptores B₂ das cininas; 100 nmol/kg, i.p., 15 min antes), **(B)** da des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (antagonista seletivo de receptores B₁ das cininas; 100 nmol/kg, i.p., 15 min antes), **(C)** do FR 173657 (antagonista seletivo de receptores B₂; 0,1 mg/orelha) e **(D)** do SSR 240612 (antagonista seletivo dos receptores B₁; 0,1 mg/orelha) sobre o edema de orelha induzido pelo TPA. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 5-7 animais.

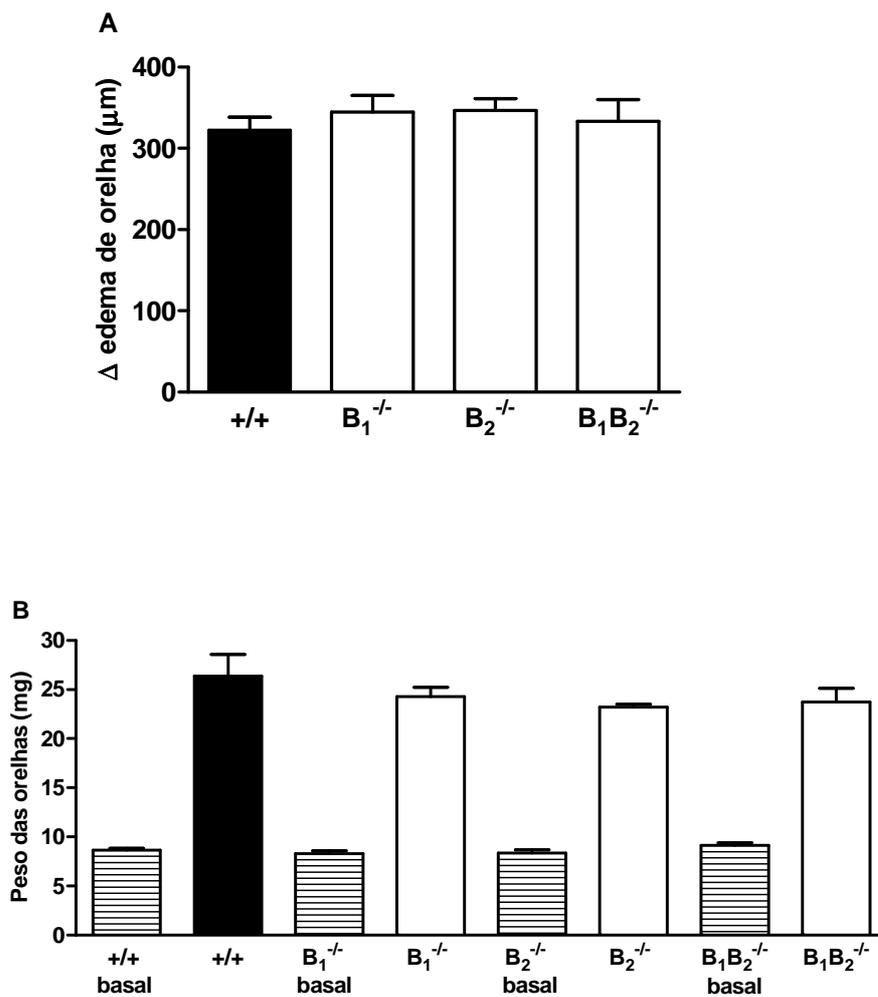


Figura 9 - Resposta dos animais nocaute no edema de orelha induzido pelo TPA. Avaliação do edema de orelha **(A)** e os respectivos pesos das orelhas **(B)** nos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) após a aplicação aguda de TPA (2,5 μg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 2-4 animais.

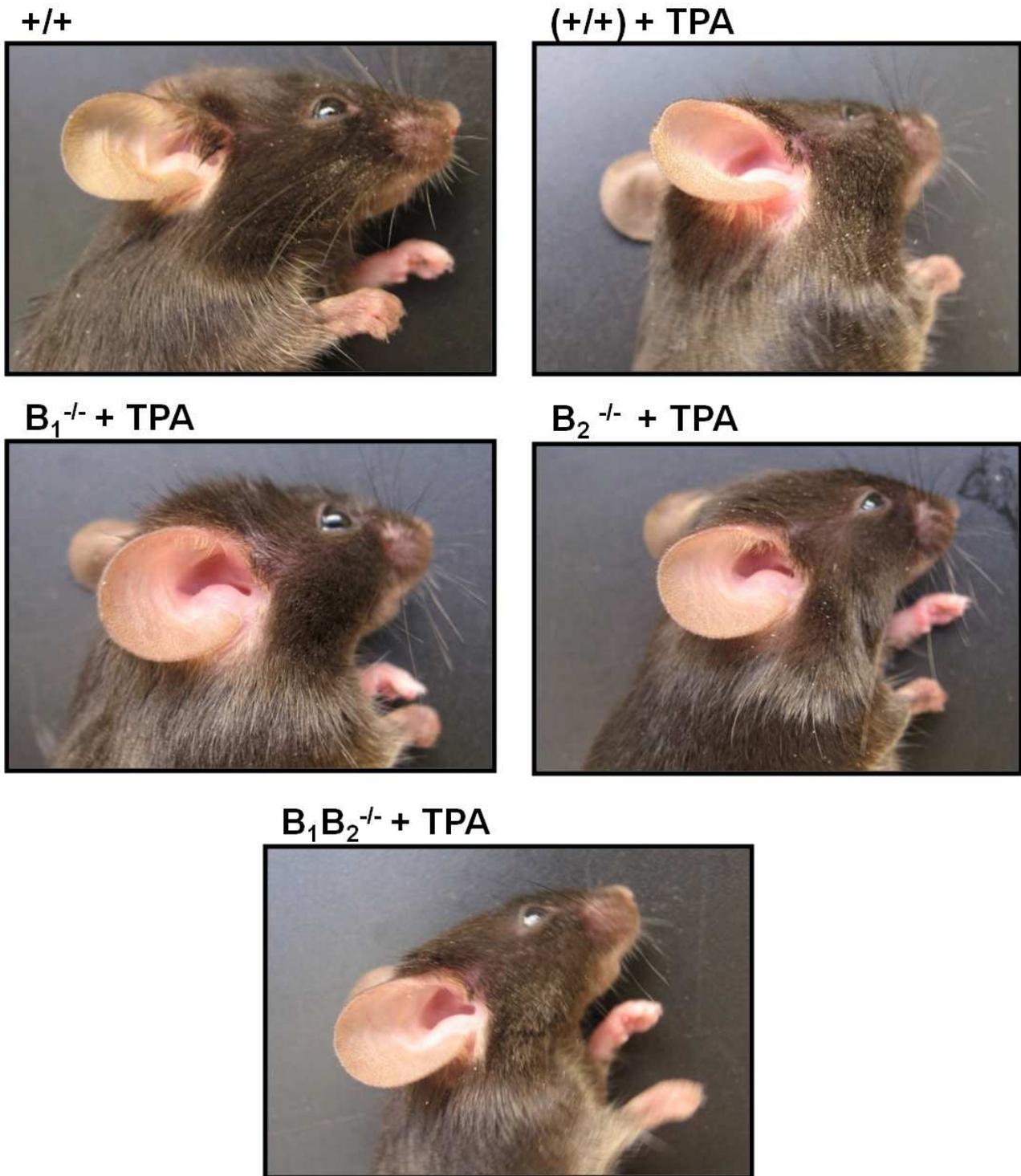


Figura 10 - Fotos representativas das orelhas dos animais nocaute 6 h após a aplicação aguda de TPA. Animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B_1 ($B_1^{-/-}$), nocaute para o receptor B_2 ($B_2^{-/-}$) e duplo nocaute B_1B_2 ($B_1B_2^{-/-}$) no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA (2,5 μg /orelha).

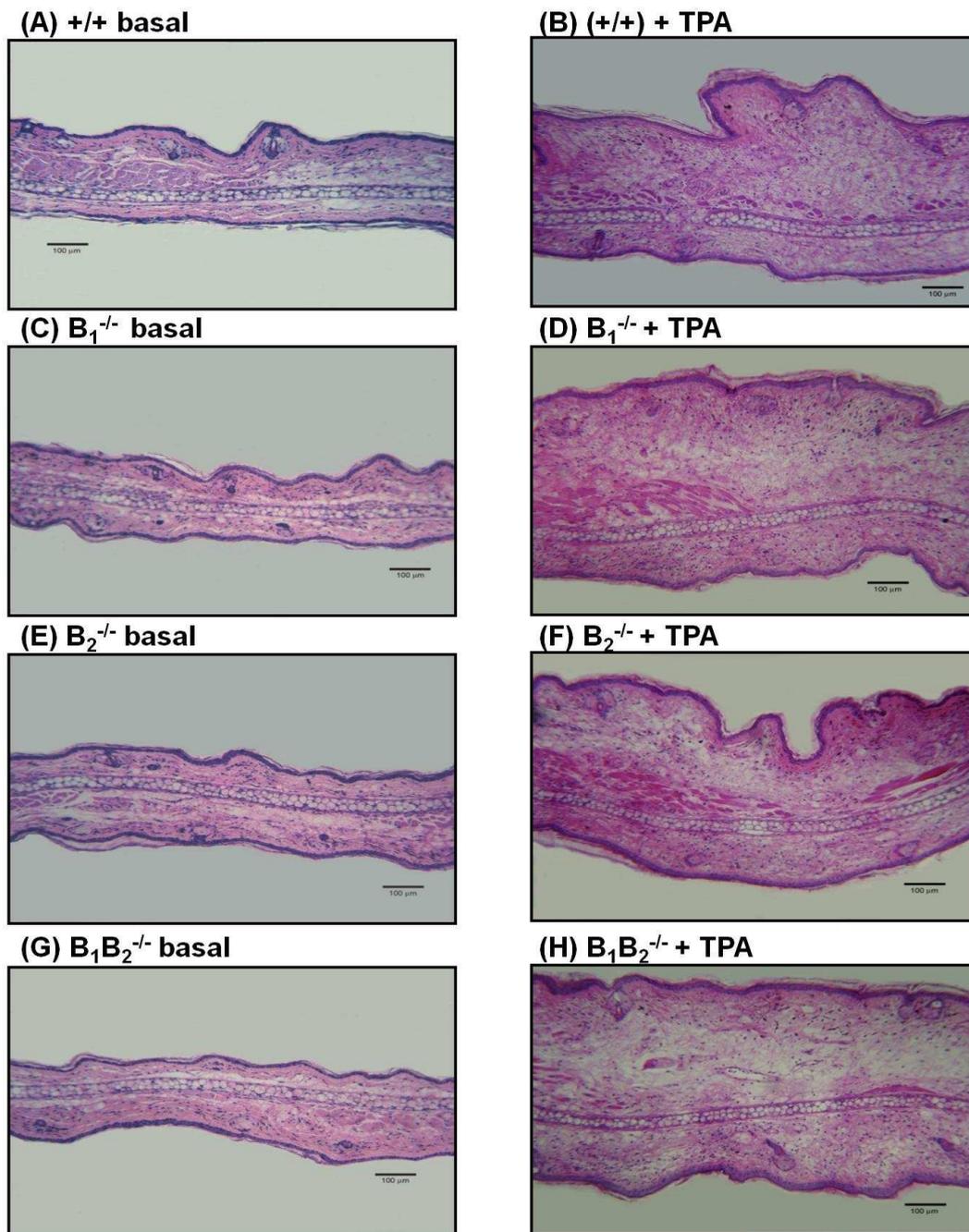


Figura 11 - Avaliação histológica após 6 h da aplicação de TPA. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) para avaliação do edema que apresenta um pico máximo em 4-6 h após a aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). **(A)** animal selvagem tratado com veículo (acetona), **(B)** animal selvagem com aplicação de TPA **(C)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) tratado com veículo **(D)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) com aplicação de TPA **(E)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) tratado com veículo **(F)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) com aplicação de TPA **(G)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) tratado com veículo **(H)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA.

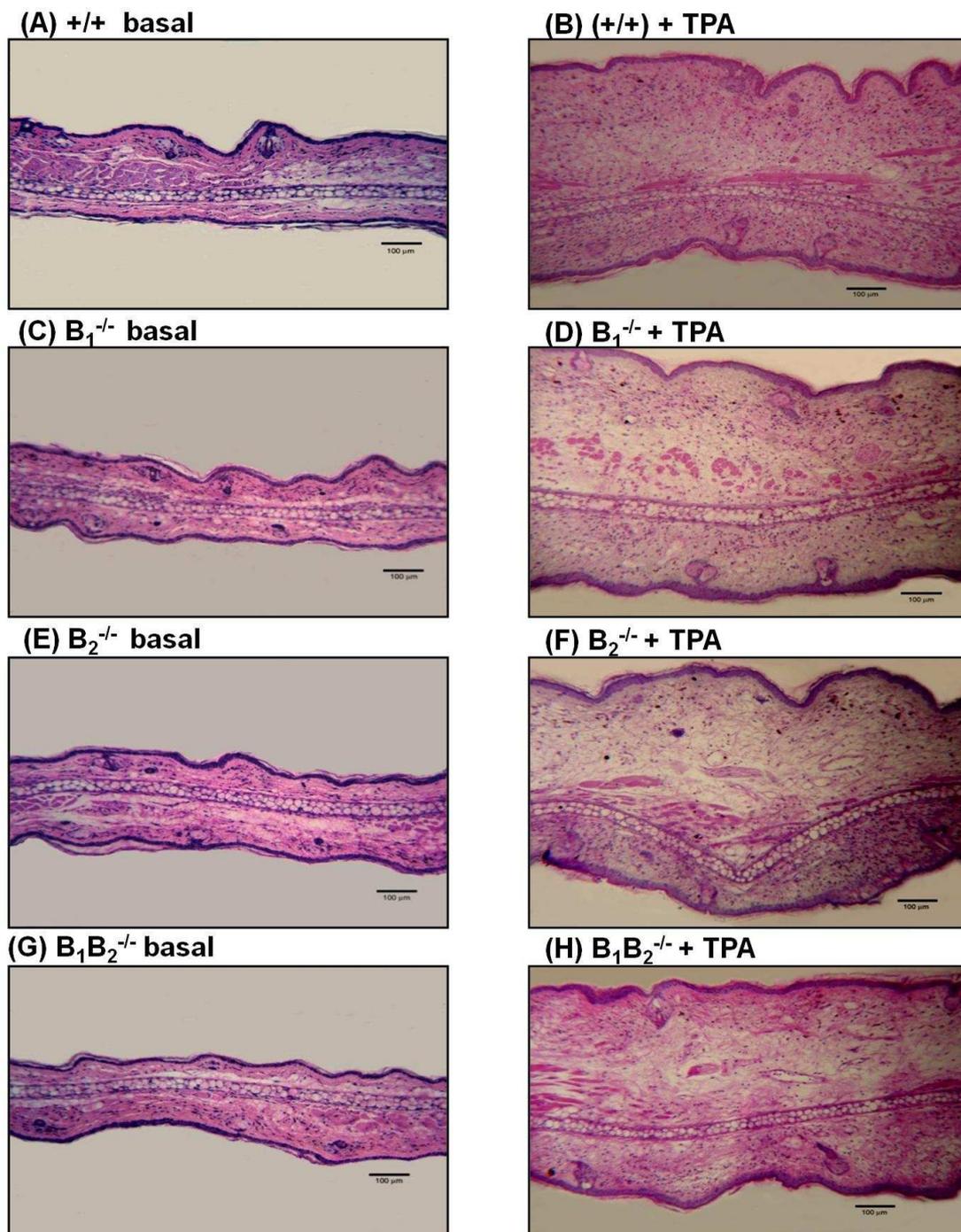


Figura 12 - Avaliação histológica após 24 h da aplicação de TPA. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) para avaliação da migração de neutrófilos que apresenta um pico máximo após 24h da aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). **(A)** animal selvagem tratado com veículo (acetona), **(B)** animal selvagem com aplicação de TPA **(C)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) tratado com veículo **(D)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) com aplicação de TPA **(E)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) tratado com veículo **(F)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) com aplicação de TPA **(G)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) tratado com veículo **(H)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA.

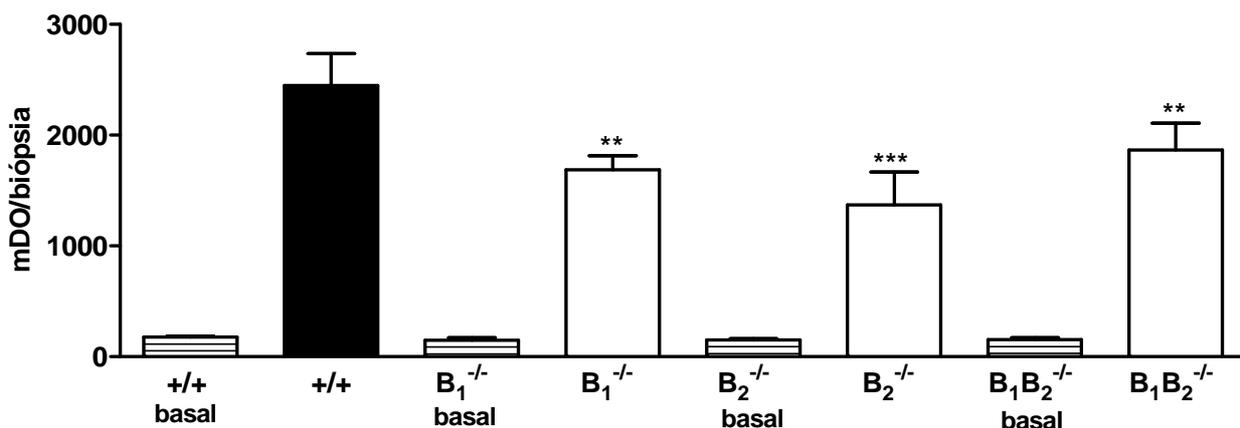


Figura 13 - Avaliação da atividade da enzima MPO após aplicação aguda de TPA nos animais nocaute. Resposta do animal selvagem tratado com veículo (acetona) (+/+ basal), animal selvagem com aplicação de TPA (+/+), animal nocaute para o receptor B₁ tratado com veículo (B₁^{-/-} basal), animal nocaute para o receptor B₁ com aplicação de TPA (B₁^{-/-}), animal nocaute para o receptor B₂ tratado com veículo (B₂^{-/-} basal), animal nocaute para o receptor B₂ com aplicação de TPA (B₂^{-/-}), animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ tratado com veículo (B₁B₂^{-/-} basal) e animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA (2,5 µg/orelha). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 2-4 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo selvagem, **P<0,01 e ***P<0,001.

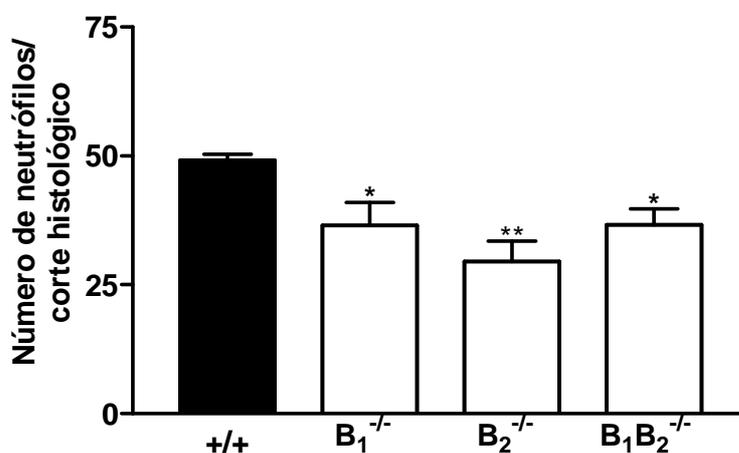


Figura 14 - Quantificação de neutrófilos 24 h após a aplicação aguda de TPA nos animais nocaute para os receptores das cininas. A quantificação de neutrófilos foi realizada para cada corte histológico com aumento de 200x. Cada coluna representa a média ± E.P.M. da quantificação de 3 campos (0,014 mm²) de cada 3 cortes histológicos distintos para cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo selvagem, *P<0,05, **P<0,01.

4.1.4. Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA

A aplicação repetida de TPA em orelhas de camundongos causa resposta inflamatória crônica caracterizada por edema, infiltração predominante de células mononucleares e hiperproliferação celular na epiderme (STANLEY *et al.*, 1991). Na Figura 15 está demonstrado o estabelecimento do processo inflamatório crônico por aplicação repetida de TPA (2,0 µg/orelha) nos animais selvagem, nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}). Os animais nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nos dias 1 e 2, e nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}), a partir do dia 4, apresentaram aumento significativo do edema, sendo mais significativo e pronunciado o aumento do edema nos animais nocaute para o receptor B₂. A medida do edema de orelha foi interrompida no quinto dia para os animais nocaute para o receptor B₂ devido à hiperproliferação intensa apresentada por estes animais, o que dificultou a medida do edema com o auxílio do micromêtro. Os animais duplo nocaute apresentaram uma resposta similar aos animais selvagem. Entretanto, a dexametasona, aplicada após o quinto dia do experimento, inibiu de forma significativa o edema induzido pelo TPA (Figura 15A). E essa resposta, mostrada no painel A, é confirmada no painel B da Figura 15 que demonstra o peso das orelhas ao final do estímulo crônico com o TPA. Os animais nocaute para o receptor B₂ apresentaram aumento significativo de 23 ± 10% no peso das orelhas e os animais selvagem tratados com a dexametasona apresentaram redução de 70 ± 3%. Além disso, a Figura 16 mostra fotos representativas das orelhas dos animais após o estímulo crônico com TPA e pode-se verificar o edema e hiperproliferação celular nos animais nocaute para o receptor B₁ e os animais nocaute para o receptor B₂. Entretanto, os animais nocaute para ambos os receptores apresentaram menor hiperproliferação quando comparado com os animais selvagem e nocaute apenas para um dos receptores. A análise histológica das amostras coletadas no quarto e nono dia após o estímulo com o TPA confirmam os resultados mostrados nas figuras anteriores e demonstra a infiltração predominante de células mononucleares e hiperproliferação celular na epiderme (Figura 17 e Figura 18). Os animais selvagem, nocaute para o receptor B₂ e para o receptor B₁ apresentaram acantose (hiperplasia epidermal), a qual foi mais pronunciada nos animais nocaute para o receptor B₂ e B₁ e menos pronunciado para os animais duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}). Posteriormente foi realizada a medida da espessura total da pele e a medida da espessura da epiderme na análise histológica (Figura 19). As

medidas foram realizadas conforme a escala em micrômetro padronizada no microscópio no qual foram feitas as fotos das lâminas em aumento de 200x. Na medida da espessura total da pele somente a dexametasona foi capaz de causar redução significativa da espessura total da pele com inibição de $23 \pm 10\%$. Entretanto, na medida da espessura da epiderme os animais nocaute para o receptor B_2 apresentaram aumento de $44 \pm 12\%$ na espessura da epiderme. Os animais duplo nocaute e os animais tratados com a dexametasona apresentaram redução significativa da espessura da epiderme com redução de $21 \pm 5\%$ e $56 \pm 2\%$, respectivamente. Posteriormente, foi avaliada a atividade das enzimas MPO e NAG. A MPO é um marcador enzimático da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado e a avaliação da atividade da NAG é uma medida indireta da infiltração de leucócitos mononucleares, a qual é uma característica desse modelo (LLORET e MORENO, 1995; STANLEY *et al.*, 1991). A aplicação tópica do TPA aumentou de forma intensa a atividade da MPO e da NAG e os animais selvagem, nocaute para o receptor B_1 , nocaute para o receptor B_2 e duplo nocaute não foram capazes de reduzir a atividade das enzimas avaliadas (Figura 20). O resultado foi confirmado por meio da quantificação de leucócitos na análise histológica que mostrou que não houve uma redução da migração celular para a derme nos animais nocaute (Figura 21).

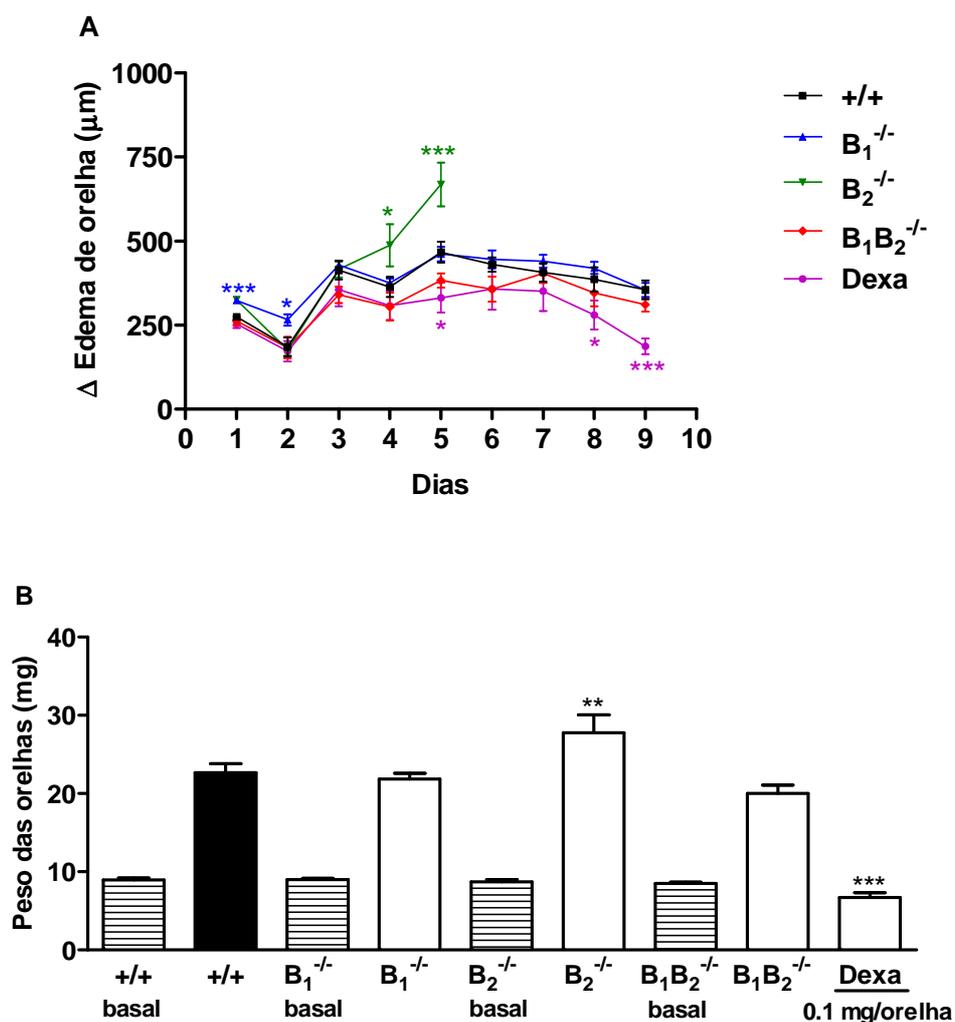


Figura 15 - Efeito da aplicação múltipla de TPA nos animais nocaute. Avaliação do edema de orelha (A) e os respectivos pesos das orelhas (B) após o estímulo crônico com TPA (9 dias; 2,0 μg/orelha) nos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}), animais duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) e animais selvagem tratados com dexametasona (0,1 mg/orelha). A medida do edema foi interrompida no quinto dia para os animais B₂^{-/-} devido à hiperproliferação intensa apresentada por estes animais. Cada ponto e cada coluna representam a média ± E.P.M. de 2-4 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo selvagem, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

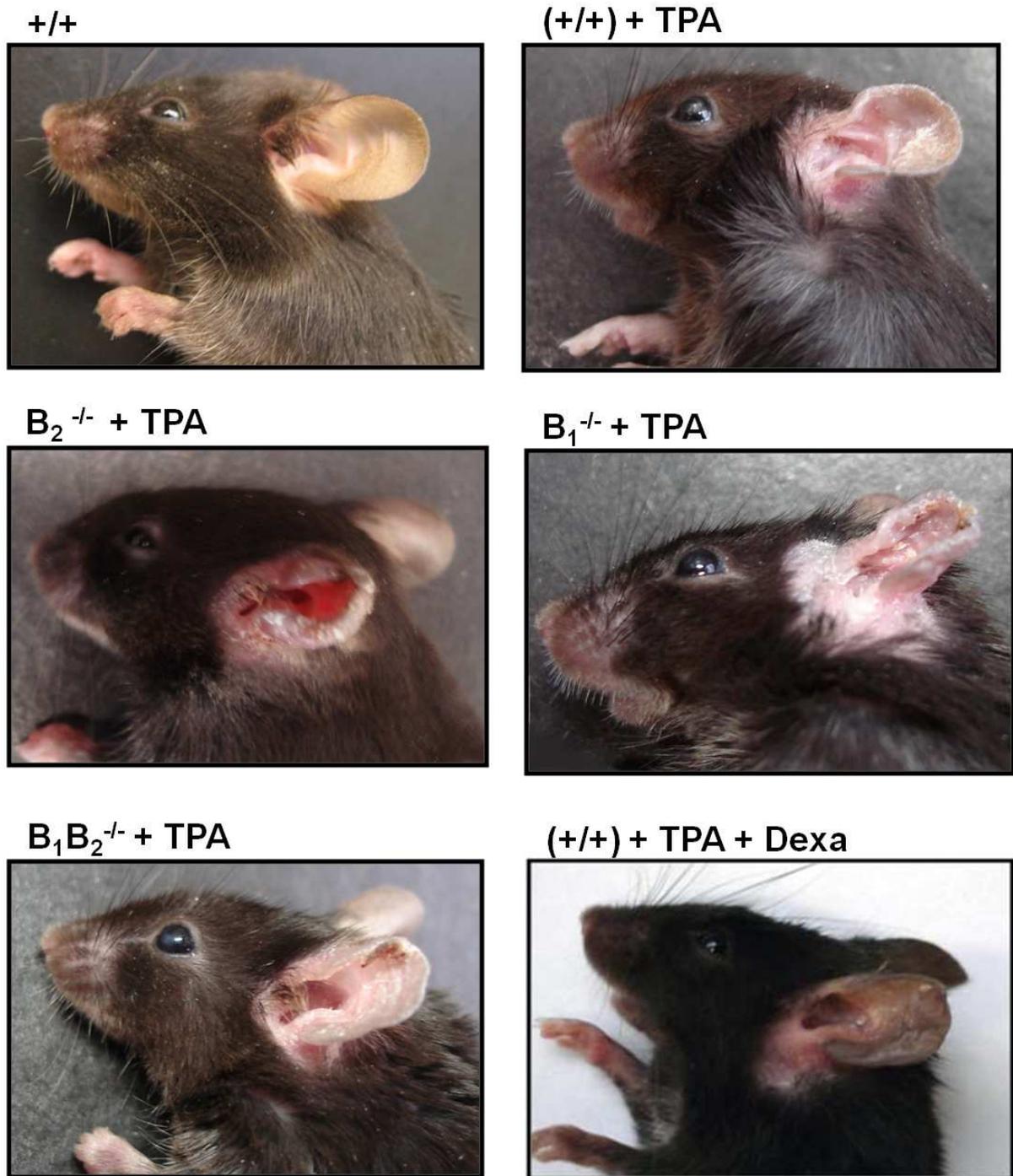


Figura 16 - Fotos representativas das orelhas dos animais nocaute após a aplicação crônica de TPA. Animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA (9 dias; 2,0 µg/orelha).

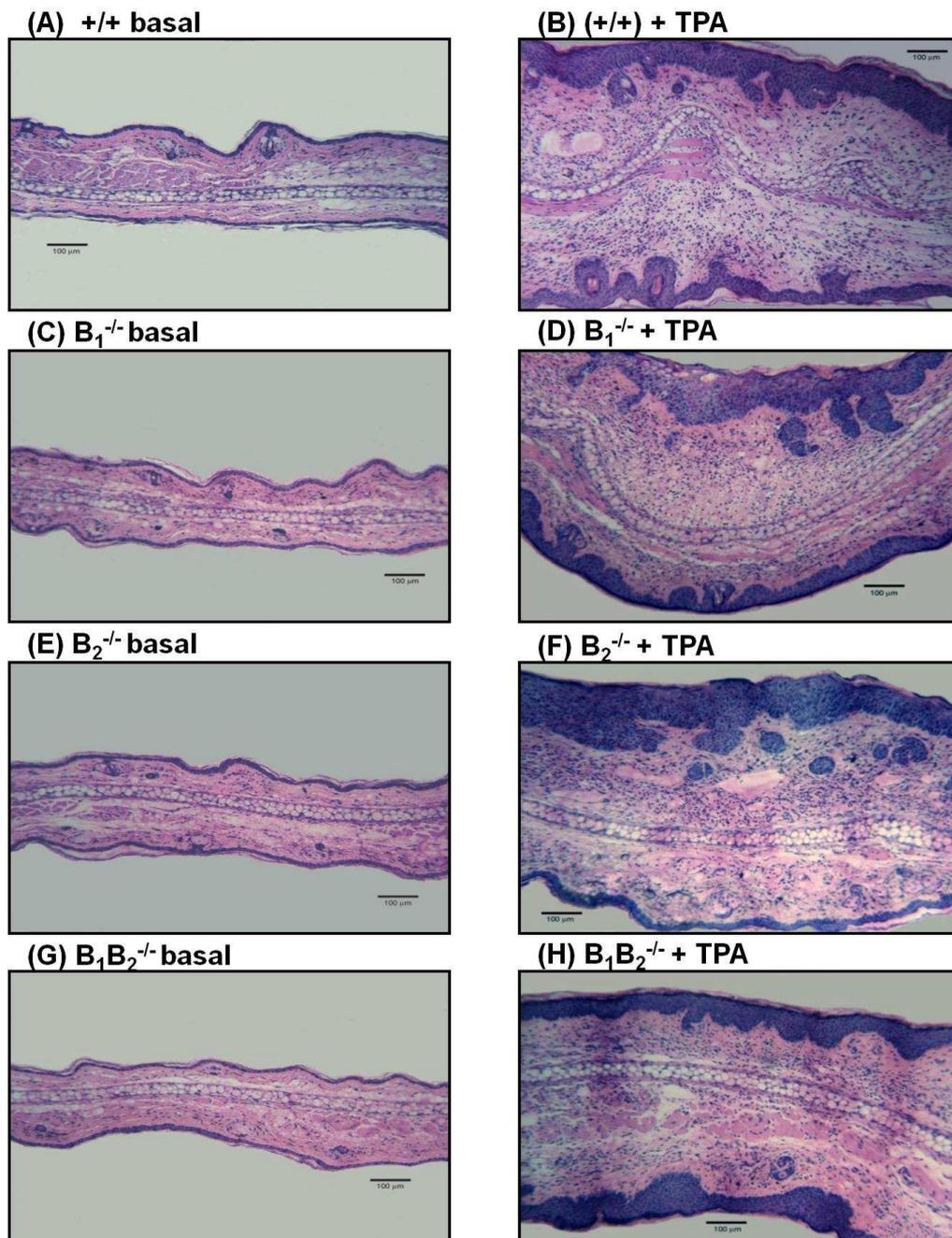


Figura 17 - Avaliação histológica após 4 dias da aplicação crônica de TPA. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) após o estímulo crônico (4 dias) com TPA (2,0 µg/orelha). **(A)** animal selvagem tratado com veículo (acetona), **(B)** animal selvagem com aplicação de TPA **(C)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) tratado com veículo **(D)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) com aplicação de TPA **(E)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) tratado com veículo **(F)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) com aplicação de TPA **(G)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) tratado com veículo **(H)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA.

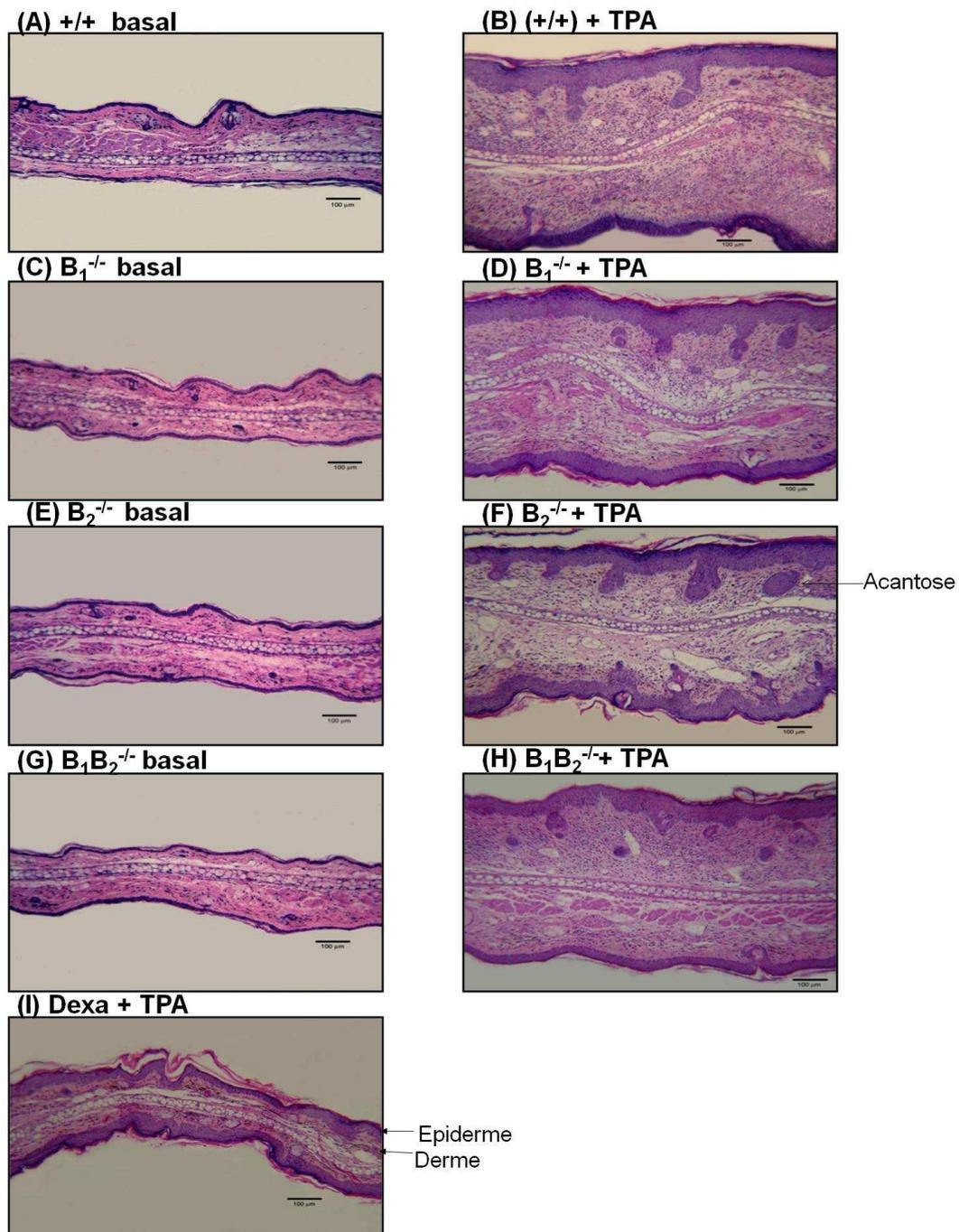


Figura 18 - Avaliação histológica no nono dia após a aplicação crônica de TPA. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 100 µm) após o estímulo crônico (9 dias) com TPA (2,0 µg/orelha). **(A)** animal selvagem tratado com veículo (acetona), **(B)** animal selvagem com aplicação de TPA **(C)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) tratado com veículo **(D)** animal nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) com aplicação de TPA **(E)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) tratado com veículo **(F)** animal nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) com aplicação de TPA **(G)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) tratado com veículo **(H)** animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA **(I)** animal selvagem tratado com dexametasona (0,1 mg/orelha).

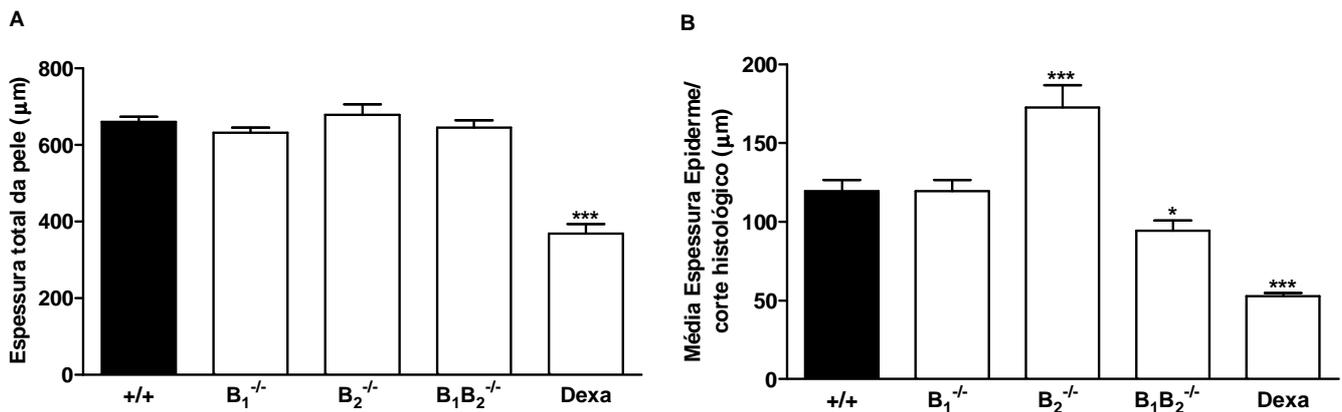


Figura 19 - Avaliação da espessura da pele após a aplicação crônica de TPA. Medida da espessura total da pele **(A)** e medida da espessura epiderme (hiperplasia epidermal) **(B)** após o estímulo crônico com TPA nos animais nocaute para os receptores das cininas. As medidas foram realizadas para cada corte histológico com aumento de 200x. Cada coluna representa a média ± E.P.M. da análise de 6 campos de cada 3-4 cortes histológicos distintos para cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo selvagem, *P<0,05, ***P<0,001.

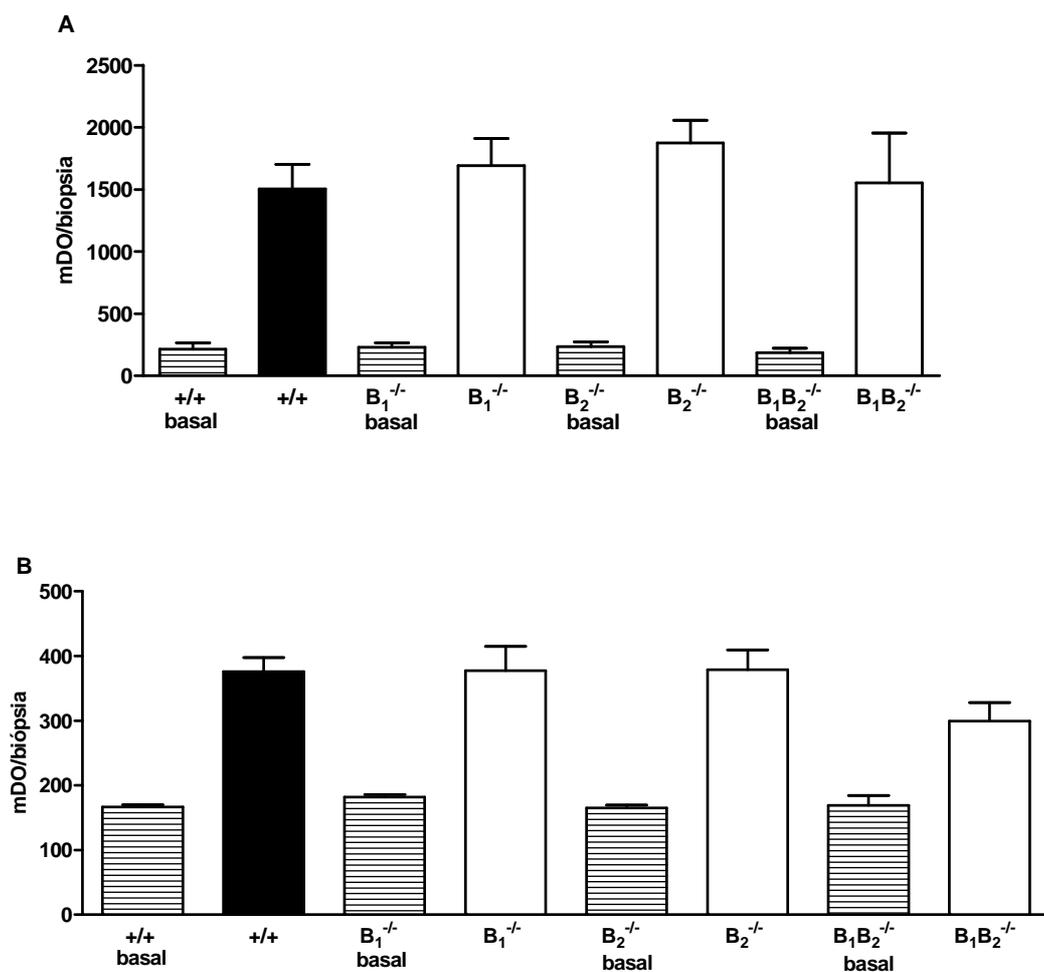


Figura 20 - Avaliação da atividade enzimática após a aplicação múltipla de TPA nos animais nocaute. Atividade da enzima MPO (**A**) e da NAG (**B**) após estímulo crônico com TPA (2,0 µg/orelha) no animal selvagem tratado com veículo (acetona) (+/+ basal), animal selvagem com aplicação de TPA (+/+), animal nocaute para o receptor B₁ tratado com veículo (B₁^{-/-} basal), animal nocaute para o receptor B₁ com aplicação de TPA (B₁^{-/-}), animal nocaute para o receptor B₂ tratado com veículo (B₂^{-/-} basal), animal nocaute para o receptor B₂ com aplicação de TPA (B₂^{-/-}), animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ tratado com veículo (B₁B₂^{-/-} basal) e animal nocaute para o receptor B₁ e B₂ (B₁B₂^{-/-}) com aplicação de TPA. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 2-4 animais.

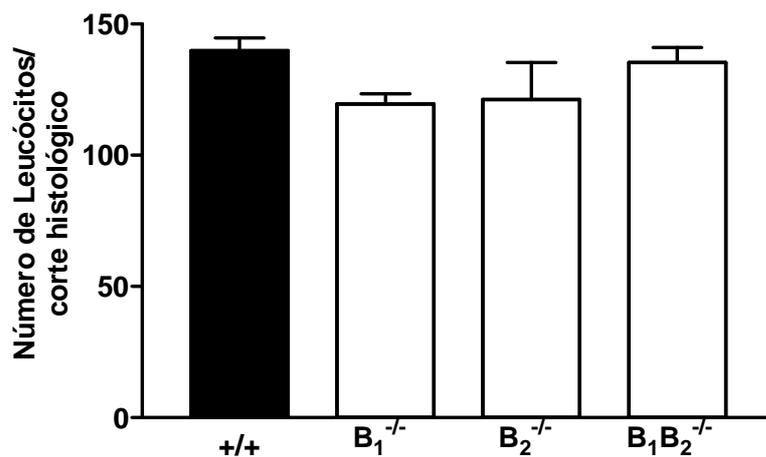


Figura 21 - Quantificação de leucócitos após a aplicação crônica de TPA nos animais nocaute para os receptores das cininas. A quantificação de neutrófilos foi realizada para cada corte histológico com aumento de 200x. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. da quantificação de 2-3 campos (0,014 mm²) de cada 2-3 cortes histológicos distintos para cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo.

4.1.5. Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de Western Blot

A síntese e expressão de PCNA estão relacionadas ao estado proliferativo das células e a expressão dessa proteína aumenta durante a fase G₁, com pico na fase S e declínio durante a fase G₂/M do ciclo celular (GAMBICHLER *et al*, 2008). A Figura 22 demonstra que os animais selvagem, nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}) e nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) apresentaram aumento da expressão da proteína PCNA após a aplicação crônica com TPA. Os animais nocaute para o receptor B₁^{-/-} e nocaute para o receptor B₂^{-/-} apresentaram aumento da expressão da proteína PCNA quando comparado com os animais selvagem, mas este aumento foi significativo somente para os animais nocaute B₂^{-/-} (22 \pm 2%). Ao contrário, os animais duplo nocaute B₁B₂ (B₁B₂^{-/-}) apresentaram redução significativa da expressão da proteína PCNA ao final do estímulo crônico com TPA (28 \pm 3%), indicando uma menor proliferação celular nos animais duplo nocaute.

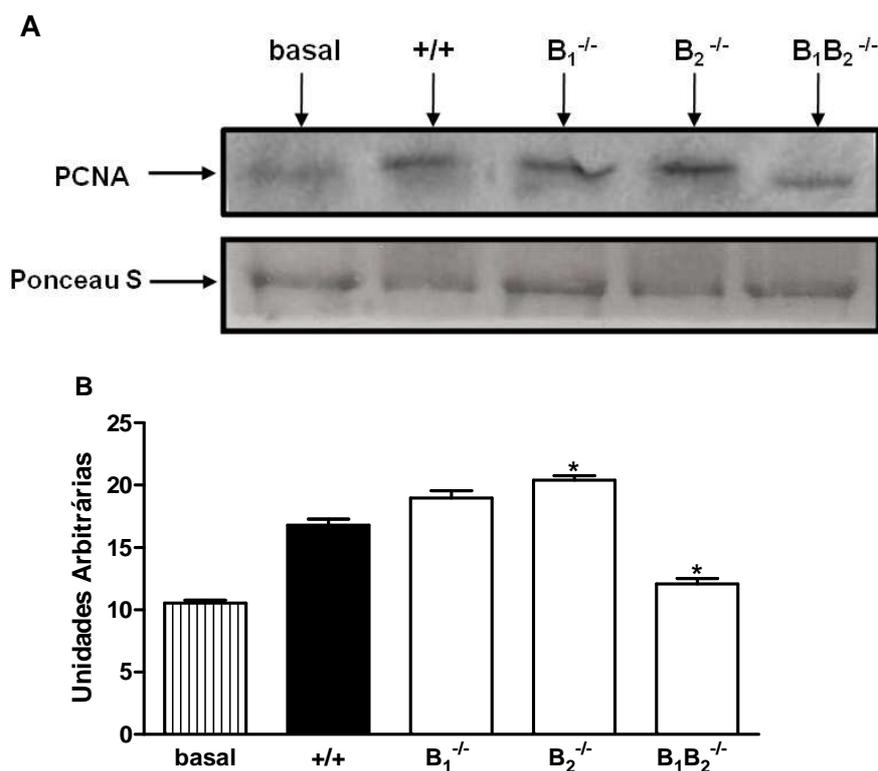


Figura 22 - Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de Western Blot após aplicação crônica de TPA. Expressão da proteína PCNA nos animais selvagem, nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) **(A)** em orelhas de camundongos com aplicações múltiplas de TPA. Análise densitométrica **(B)** das bandas imunorreativas. Resultados expressos em unidades arbitrárias e expressos como a média ± E.P.M. de 2 experimentos. Difere significativamente do grupo selvagem (+/+), *P<0,05.

4.1.6. Avaliação dos níveis da proteína PCNA por imunohistoquímica

Empregando a técnica de imunohistoquímica foi feita a avaliação dos níveis da proteína PCNA nos animais selvagem, nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e duplo nocaute após a aplicação crônica de TPA. Os animais nocaute para o receptor B₁ e nocaute para o receptor B₂ apresentaram significativa marcação para PCNA, coloração visualizada em marrom, indicando aumento da proliferação celular nestes animais, sendo que este aumento foi significativo nos animais nocaute para o receptor B₂ (22 ± 10%). Entretanto, os animais duplo nocaute apresentaram redução significativa da marcação para a proteína PCNA (38 ± 8%), quando comparado com os animais selvagem e os animais nocaute para apenas um dos receptores das cininas, confirmando os resultados anteriores que já demonstravam redução da proliferação celular nos animais duplo nocaute. Além disso, para todos os animais a marcação para

PCNA foi mais específica para a camada basal da epiderme, onde estão localizadas as células proliferativas da pele (Figura 23 e Figura 24).

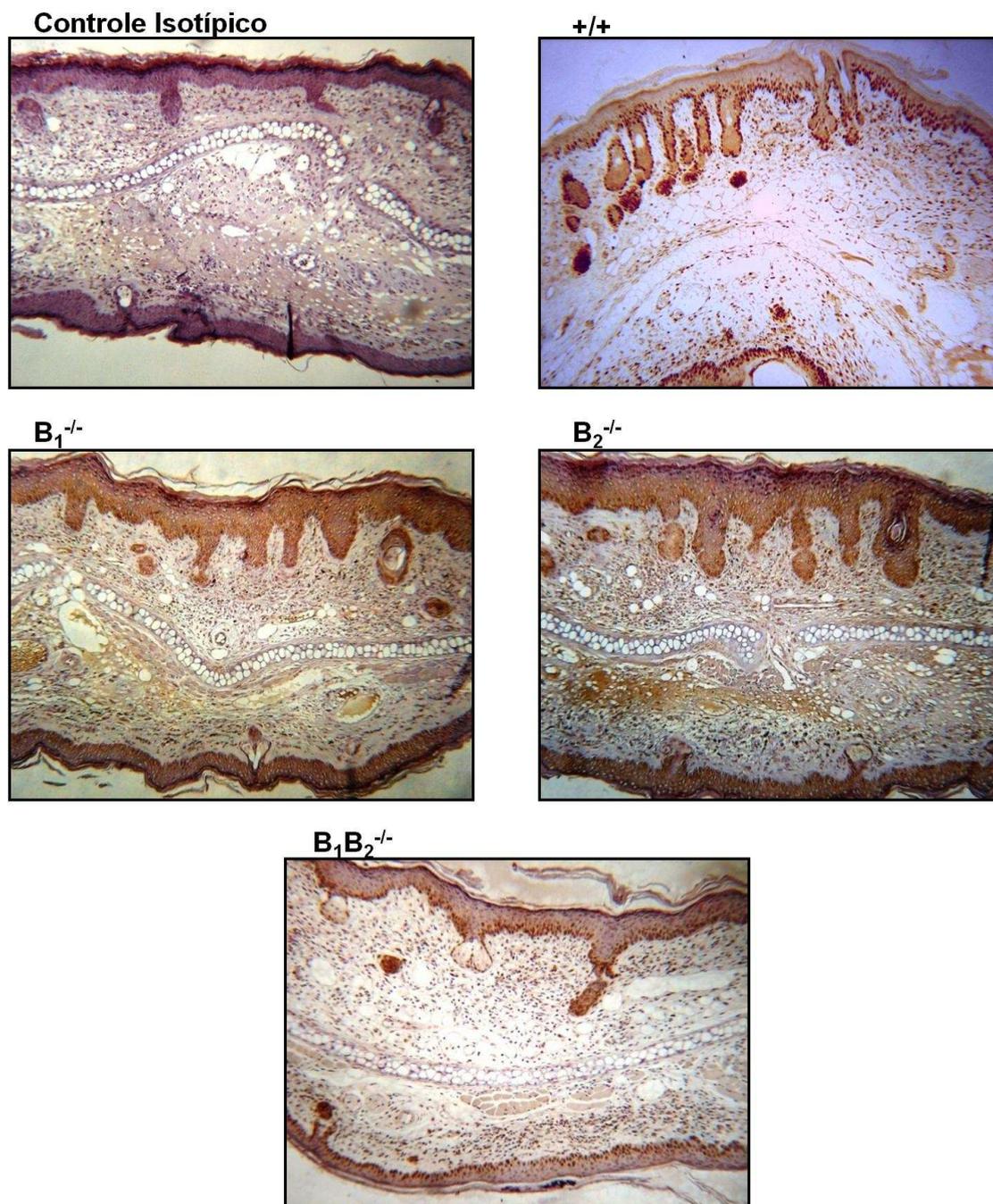


Figura 23 - Avaliação dos níveis da proteína PCNA por Imunohistoquímica após aplicação crônica de TPA. Marcação de PCNA nos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) após o estímulo crônico com TPA. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais das orelhas dos animais coradas com o cromógeno diaminobenzidina e contra-coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x) coletadas após a aplicação múltipla de TPA.

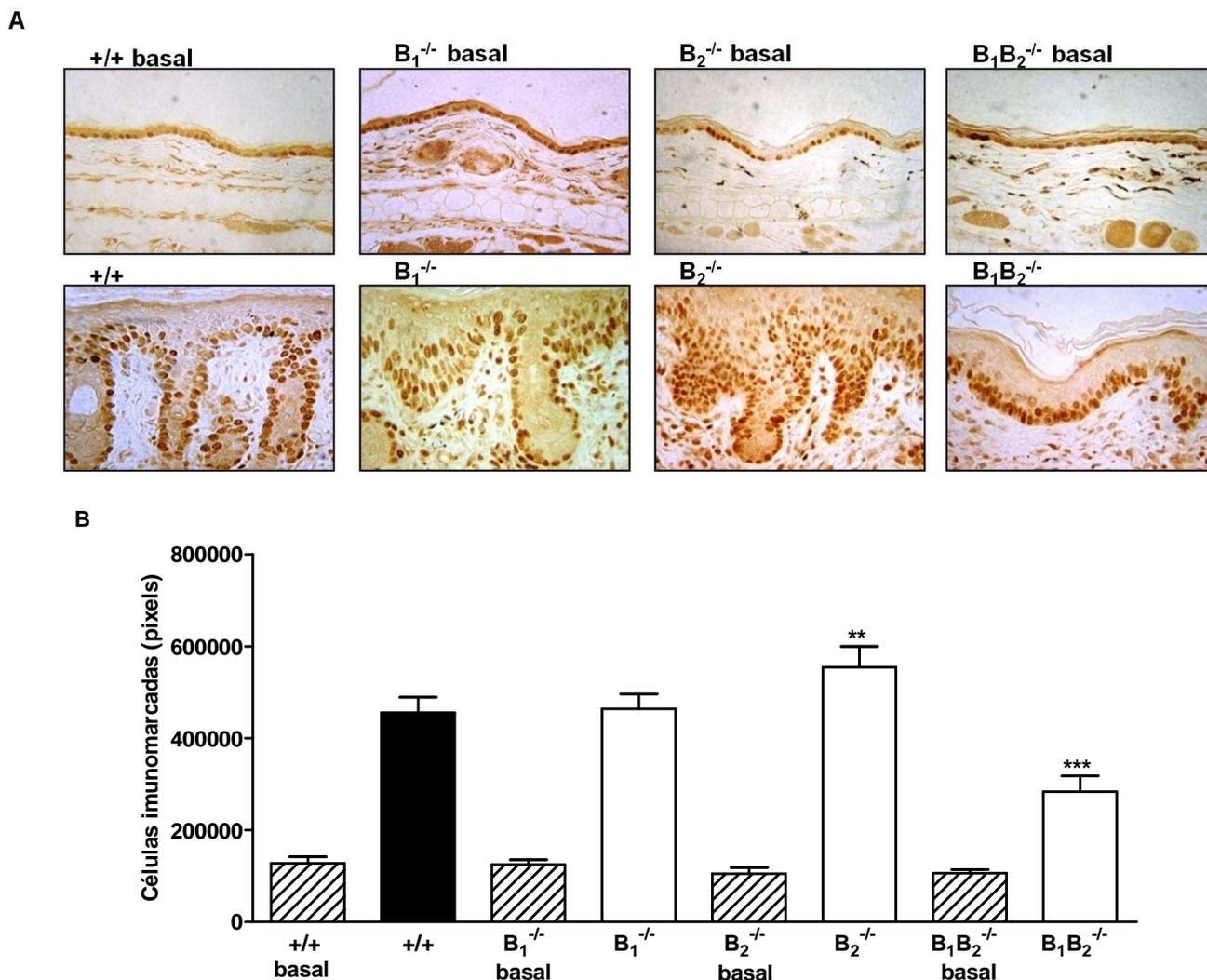


Figura 24 - Quantificação da marcação da proteína PCNA por Imunohistoquímica. (A) Fotos representativas de 3-5 cortes transversais das orelhas dos animais selvagem (+/+), nocaute para o receptor B₁ (B₁^{-/-}), nocaute para o receptor B₂ (B₂^{-/-}) e duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) coradas com o cromógeno diaminobenzidina e não contra-coradas com hematoxilina (aumento de 400x) coletadas após a aplicação múltipla de TPA. (B) Quantificação da marcação de PCNA em pixels. Cada coluna representa a média ± E.P.M. da quantificação de 5 diferentes áreas (40x) de cada 3-5 cortes histológicos distintos de cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo selvagem (+/+). Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01 e ***P<0,001.

4.1.7. Avaliação dos antagonistas SSR 240612 e FR 173657 no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA

A Figura 25 demonstra que após o estabelecimento do processo inflamatório crônico por aplicação repetida de TPA, o tratamento crônico com os antagonistas SSR

240612 (antagonista não-peptídico B₁), FR 173657 (antagonista não-peptídico B₂) e a associação dos antagonistas foram capazes de promover a inibição do edema de forma significativa (painel A). A determinação do peso das orelhas ao final do tratamento crônico (Figura 25B) confirma o resultado obtido no painel A e mais claramente demonstra que ocorreu a inibição do edema de forma significativa com inibição calculada de $14 \pm 5\%$, $23 \pm 4\%$ e $22 \pm 6\%$ para o SSR 240612, FR 173657 e SSR + FR; respectivamente. A determinação do peso, neste modelo crônico de inflamação, é uma medida mais precisa do que a determinação do edema realizada com o auxílio do micrômetro devido à hiperproliferação celular intensa que ocorre com a aplicação crônica de TPA, o que dificulta a realização da medida do edema. As fotos das orelhas dos animais ao final do tratamento confirmam os resultados obtidos e ilustram claramente a redução do edema observada com o tratamento com os antagonistas não-peptídicos (Figura 26). Além disso, as amostras de tecido das orelhas dos animais foram retiradas para análise histológica (Figura 27). As análises histológicas das amostras coletadas no nono dia após o estímulo com o TPA confirmam os resultados mostrados nas figuras anteriores, correspondentes aos resultados obtidos com os antagonistas não-peptídicos no edema de orelha e as fotos representativas das orelhas ao final do tratamento. Os animais controle apresentaram pronunciada acantose (hiperplasia epidermal) e os animais tratados com os antagonistas SSR 240612, FR 173657 e a associação dos antagonistas apresentaram redução significativa da hiperplasia epidermal. Posteriormente foi realizada a medida da espessura total da pele e a medida da espessura da epiderme na análise histológica que confirmam os resultados anteriores (Figura 28). As medidas foram realizadas conforme a escala em micrômetro padronizada no microscópio no qual foram feitas as fotos das lâminas em aumento de 100x e 200x. Portanto, os animais tratados com o SSR 240612, FR 173657 e a associação dos antagonistas apresentaram redução significativa da espessura total da pele com inibição de $40 \pm 3\%$, $47 \pm 2\%$ e $57 \pm 2\%$, respectivamente. Da mesma forma, os antagonistas SSR 240612, FR 173657 e a associação dos antagonistas também foram capazes de inibir a medida da espessura da epiderme com inibição de $32 \pm 2\%$, $30 \pm 9\%$ e $38 \pm 4\%$, respectivamente. Além disso, a infiltração de neutrófilos e leucócitos mononucleares é característica nesse modelo, assim a avaliação da atividade da MPO e da NAG é uma medida indireta da infiltração destes tipos celulares, respectivamente. A Figura 29 (A e B) demonstra que os antagonistas não-peptídicos não foram capazes de

inibir a atividade da MPO e da NAG. Além disso, a quantificação do influxo de leucócitos na análise histológica confirma que os antagonistas não foram capazes de promover alteração da migração celular (Figura 30).

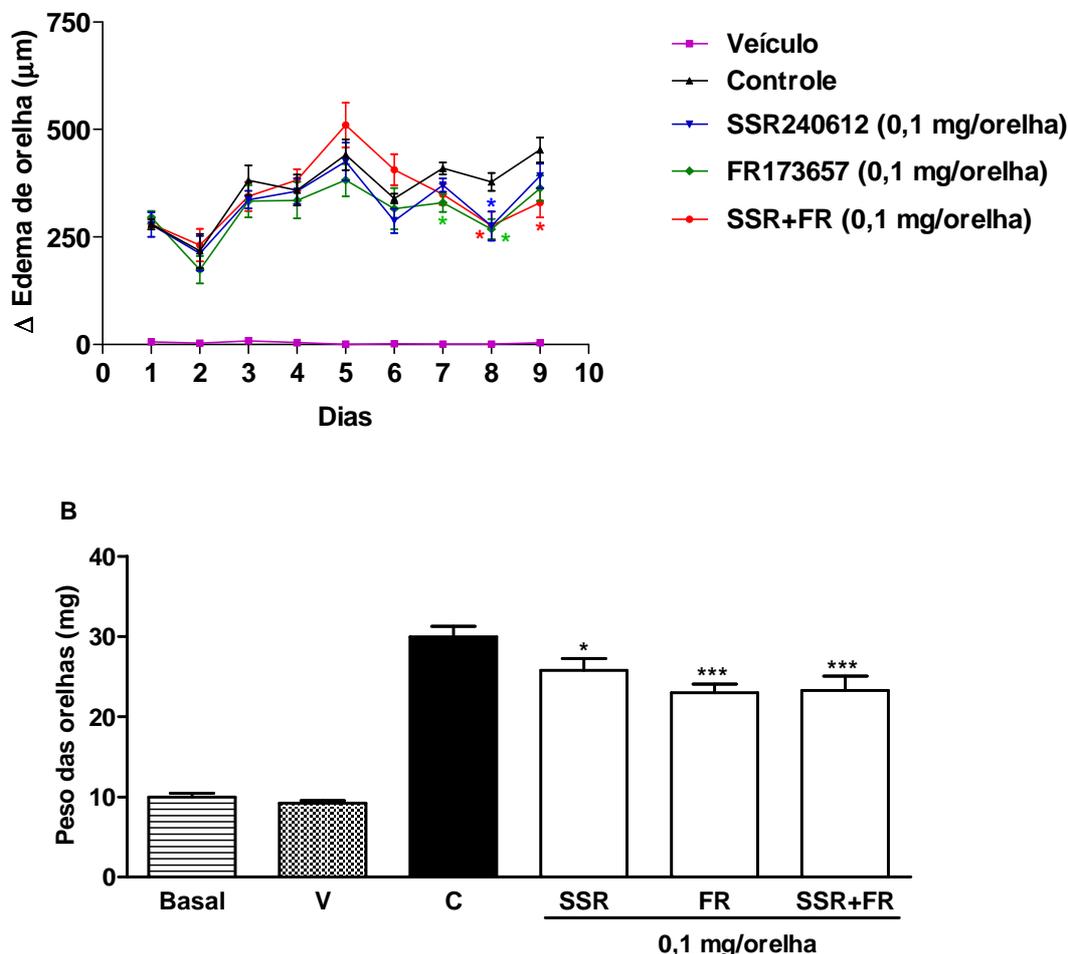


Figura 25 - Efeito dos antagonistas não-peptídicos no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O SSR 240612 (antagonista do receptor B₁), FR 173657 (antagonista do receptor B₂) e a associação dos antagonistas (SSR + FR) foram aplicados topicamente (0,1 mg/orelha) durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação de TPA. Avaliação do edema de orelha **(A)** e os respectivos pesos das orelhas **(B)** após o estímulo crônico com TPA (2,0 µg/orelha). Cada ponto e cada coluna representam a média ± E.P.M. de 2-4 animais. Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001.

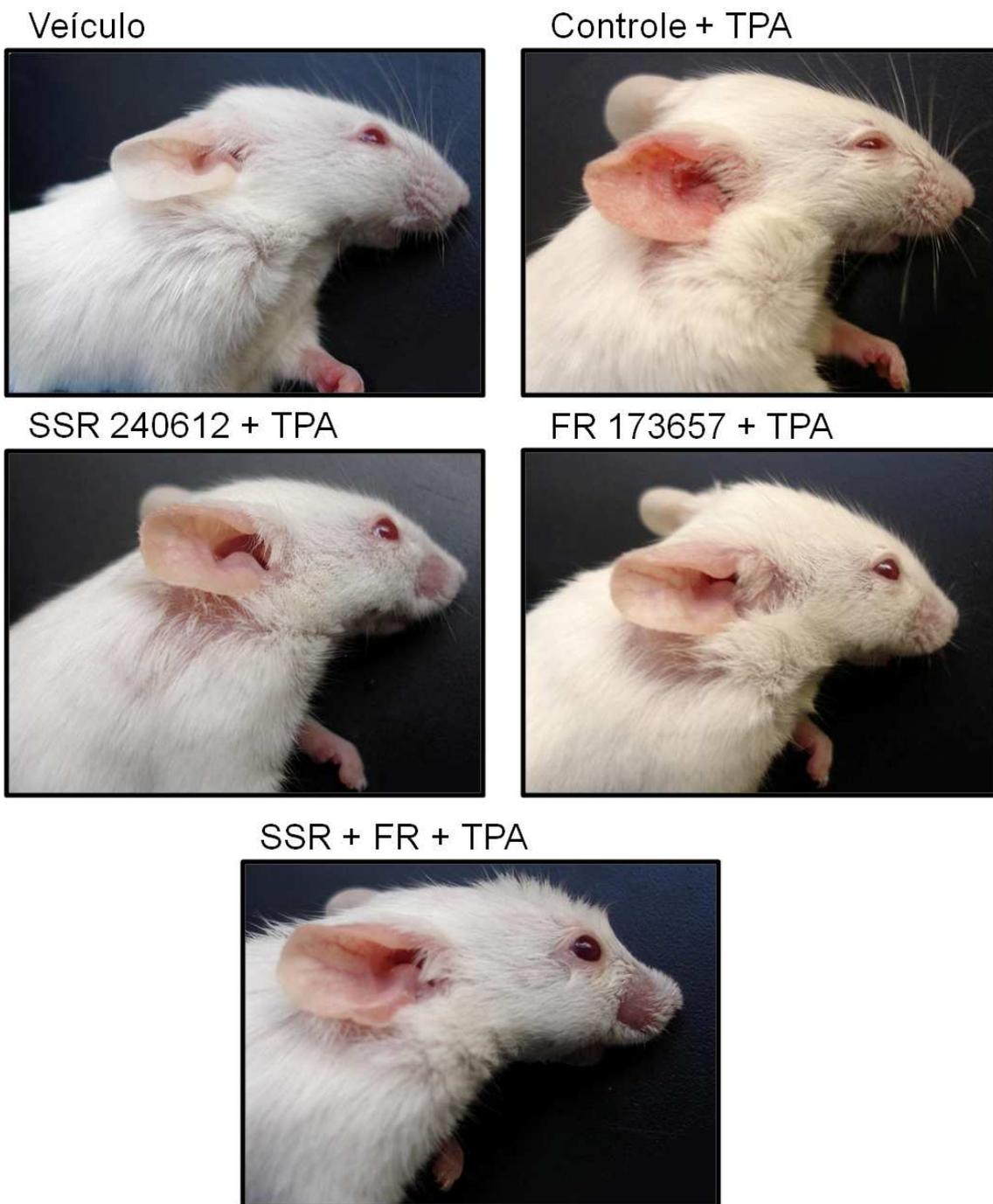


Figura 26 - Fotos representativas das orelhas dos animais após o tratamento com os antagonistas não-peptídicos no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA. Efeito do SSR 240612 (antagonista do receptor B₁), FR 173657 (antagonista do receptor B₂) e a associação dos antagonistas (SSR + FR) após aplicação de TPA (9 dias; 2,0 µg/orelha).

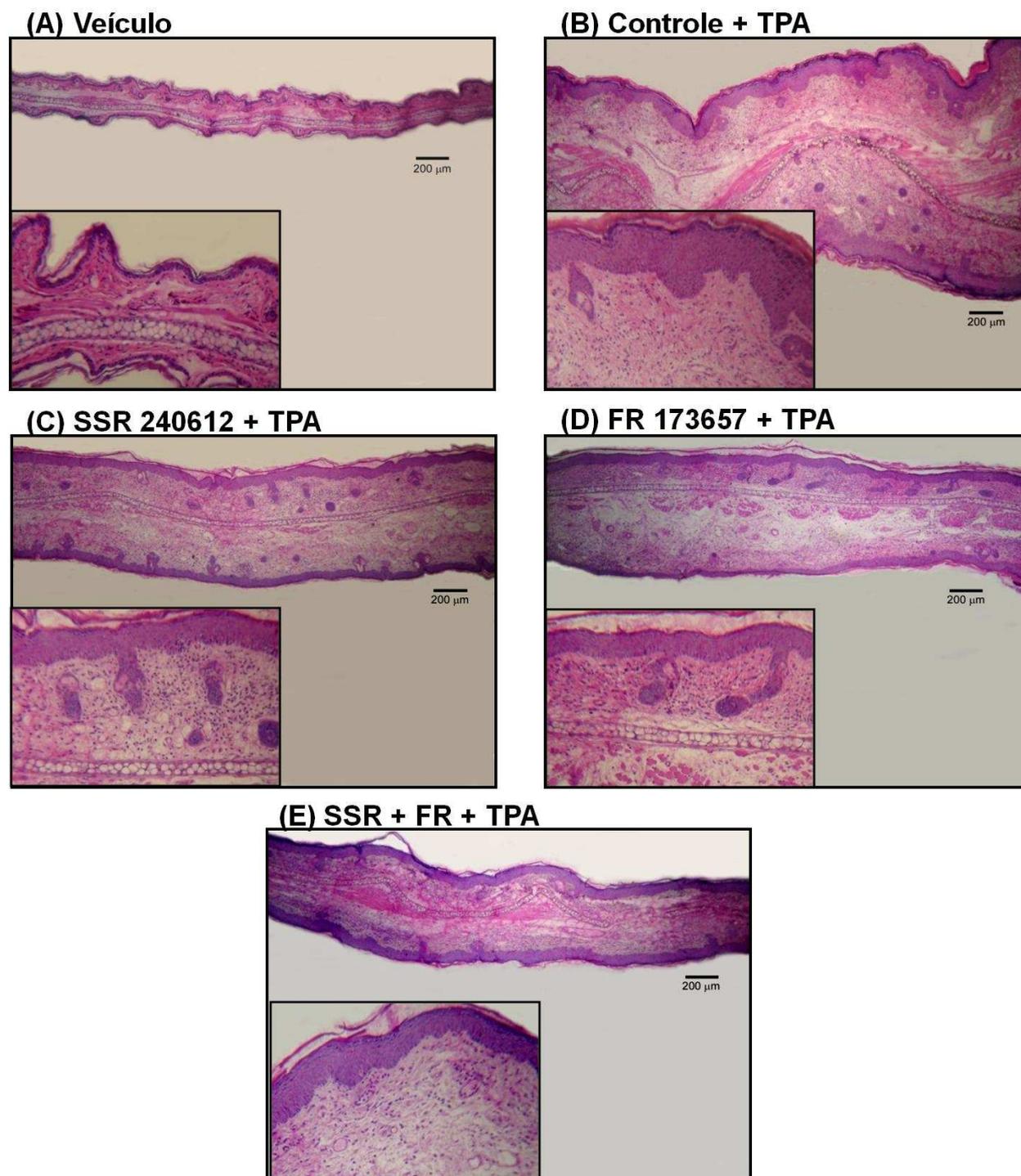


Figura 27 - Avaliação histológica do efeito dos antagonistas não-peptídicos no modelo do TPA crônico. Fotos representativas de 3-5 cortes transversais de orelhas de camundongos swiss coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 100x com seu correspondente aumento em 200x; escala de 200 μm e 100 μm, respectivamente) após o estímulo crônico (9 dias) com TPA (2,0 μg/orelha). **(A)** veículo, **(B)** controle (animal tratado com TPA), **(C)** SSR 240612 (0,1 mg/orelha) **(D)** FR 173657 (0,1 mg/orelha), **(E)** SSR 240612 (0,1 mg/orelha) plus FR 173657 (0,1 mg/orelha).

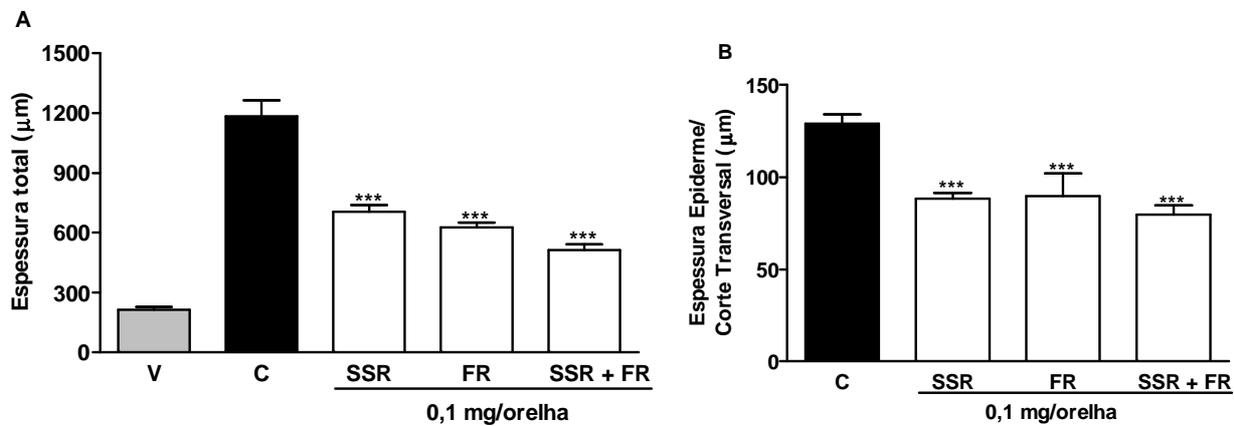


Figura 28 - Efeito dos antagonistas não-peptídicos na determinação da espessura da pele. (A) medida da espessura total da pele e **(B)** medida da espessura epiderme (hiperplasia epidermal) após o estímulo crônico com TPA. O veículo (V), SSR 240612 (SSR), FR 173657 (FR) e a associação dos antagonistas (SSR + FR) foram aplicados topicamente (0,1 mg/orelha). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. da análise de 6 campos de cada 2-3 cortes histológicos distintos para cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo (aumento de 100x para medida da espessura total da pele e aumento de 200x para medida da espessura da epiderme). Os asteriscos demonstram o nível de significância quando comparado com o grupo controle (C). Difere significativamente do grupo controle, *** $P < 0,001$.

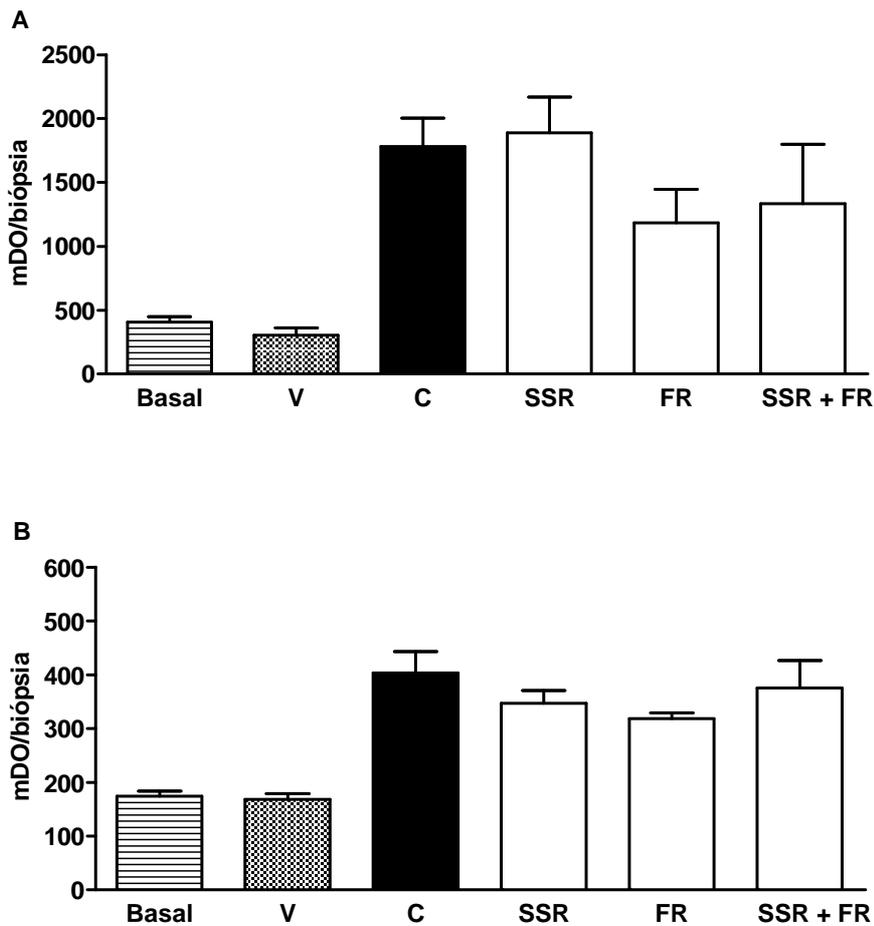


Figura 29 - Efeito dos antagonistas não-peptídicos na atividade enzimática da MPO e da NAG. O SSR 240612 (antagonista do receptor B₁), FR 173657 (antagonista do receptor B₂), a associação dos antagonistas (SSR + FR) e o veículo (V) foram aplicados topicamente (0,1 mg/orelha) durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação de TPA. No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas para avaliação da atividade da MPO (**A**) e da NAG (**B**). Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 2-4 animais.

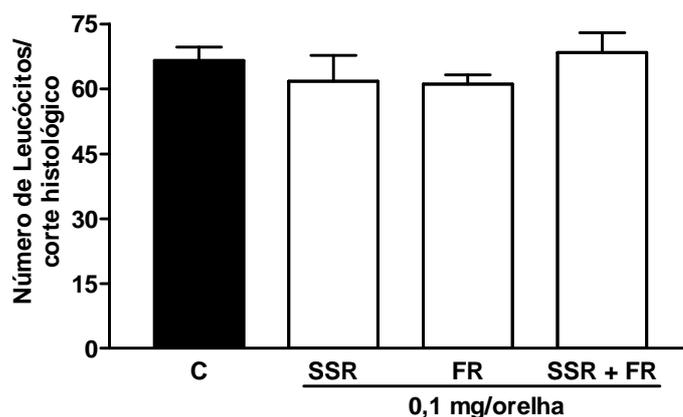


Figura 30 - Efeito dos antagonistas não-peptídicos na quantificação de leucócitos após a aplicação crônica de TPA. O SSR 240612 (antagonista do receptor B₁), FR 173657 (antagonista do receptor B₂) e a associação dos antagonistas (SSR + FR) foram aplicados topicamente (0,1 mg/orelha) e amostras da orelhas foram coletadas para avaliação histológica. A quantificação de neutrófilos foi realizada para cada corte histológico com aumento de 200x. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. da quantificação de 2-3 campos (0,014 mm²) de cada 2-3 cortes histológicos distintos para cada amostra de orelha coletada de 2-4 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

As cininas têm participação em múltiplos processos como no controle da pressão sanguínea, contração e relaxamento do músculo liso, respostas inflamatórias, indução da nocicepção e hiperalgesia. Acredita-se que as cininas também estão envolvidas em muitos estados patológicos como a asma, alergia, artrite reumatóide, choque endotóxico e pancreatite (CALIXTO *et al.*, 2000). No entanto, muito pouco é conhecido quanto ao envolvimento das cininas em doenças da pele. Assim, o presente estudo procurou avaliar a participação das cininas em diferentes modelos de inflamação cutânea.

Uma das metodologias utilizada foi a indução de edema na orelha de camundongos causada pela aplicação tópica de capsaicina. A capsaicina é a substância ativa responsável pelos efeitos irritantes e pungentes das pimentas. Quando aplicada topicamente é capaz de ativar o receptor TRPV1 (receptor vanilóide tipo 1), induzindo resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por forte extravasamento plasmático e conseqüente formação de edema. Os estudos demonstram que o mecanismo pelo qual a capsaicina produz edema é diferente dos outros modelos de inflamação cutânea. Portanto, na pele a capsaicina promove ativação de nervos sensoriais, liberando neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P, neurocinina A e peptídeo vasoativo intestinal (VIP), os quais induzem a formação de edema. Além disso, os neuropeptídeos apresentam papel importante na liberação de histamina e serotonina que são mediadores secundários no aumento da permeabilidade vascular (GABOR e RAZGA, 1992; SANCHEZ e MORENO, 1999; GÁBOR, 2000; SHOLZEN *et al.*, 2003). O processo inflamatório denominado de inflamação neurogênica se desenvolve como resultado da ativação de nervos sensoriais que secretam neuropeptídeos em vários tecidos, incluindo a pele. Neuropeptídeos secretados na pele não são somente neurotransmissores da dor e do prurido, mas também apresentam um papel como mediadores inflamatórios e do sistema imune (ZEGARSKA, 2006).

As cininas parecem estar diretamente envolvidas nos eventos da inflamação neurogênica pela ativação das fibras-C e conseqüentemente, liberação de neuropeptídeos como a substância P e CGRP. Também foi demonstrado que parte das ações das cininas pode resultar de interações não-receptor, as quais parecem estar associadas com sua habilidade da liberação direta da histamina e 5-hidroxitriptamina dos

mastócitos (CALIXTO *et al.*, 2000). Outro mecanismo pelo qual a BK participa na inflamação neurogênica é por meio da estimulação dos receptores B₁ e B₂ acoplados a proteína G, ocasionando a ativação da PKC que por sua vez fosforila o receptor TRPV1, o que aumenta a probabilidade de abertura do canal (STÄNDER *et al.*, 2004; PLANELLS-CASES *et al.*, 2005). A clonagem do receptor TRPV1 contribuiu para o entendimento do mecanismo molecular envolvido na inflamação neurogênica. O receptor TRPV1 tem um papel essencial que contribui para a integração de vários estímulos e modula a excitabilidade do nociceptor, sendo essencial na transdução da dor. A importante contribuição do receptor TRPV1 no início e na manutenção da inflamação neurogênica tem validado o seu papel como alvo terapêutico principalmente no tratamento da dor (PLANELLS-CASES *et al.*, 2005). Além disso, já foi demonstrado que os queratinócitos expressam o receptor TRPV1 e ativação destes receptores resulta na produção de mediadores pró-inflamatórios na epiderme. O receptor TRPV1, expresso em cultura de queratinócitos, pode ser ativado pela capsaicina levando a um influxo de cálcio para o interior destas células (DENDA *et al.*, 2001; INOUE *et al.*, 2002; SOUTHALL *et al.*, 2003). Portanto, a ativação do receptor TRPV1 epidermal e a subsequente elevação de cálcio intracelular são muito importante para que ocorra a produção de mediadores pró-inflamatórios nos queratinócitos (SOUTHALL *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que as cininas parecem participar da inflamação neurogênica cutânea mediada pela capsaicina através dos dois receptores, B₁ e B₂. Isto se deve ao fato que os dois antagonistas seletivos testados por via i.p., des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e Hoe 140 foram capazes de inibir significativamente e de modo dependente da dose o edema gerado pela aplicação tópica de capsaicina. Resultado semelhante foi observado com outro antagonista peptídico dos receptores B₁ o R-715, quando este foi administrado pela via i.p. Na comparação entre os dois antagonistas do receptor B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e R-715, é possível observar uma diferença substancial quanto a potência, provavelmente porque em roedores a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK pode agir como agonista parcial (CAMPOS *et al.*, 2006). Outro fato que pode contribuir para esta diferença é que o R-715 é mais resistente à degradação enzimática quando comparado com a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (GOBEIL *et al.*, 1999). Vianna *et al.* (2003) mostraram que a migração pleural de mononucleares e neutrófilos induzida pela des-Arg⁹-BK em ratos diabéticos por estreptozotocina, é significativamente reduzida pelo

tratamento com R-715. Também foi demonstrado que o R-715 é capaz de inibir o acúmulo de neutrófilos no modelo de pleurisia induzido pela carragenina (COSTA *et al.*, 2006).

Mantione e Rodriguez (1990) já mostraram que o NPC 567 (antagonista não seletivo dos receptores B₁ e B₂) e o antagonista específico do receptor B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, quando aplicados topicamente, foram efetivos em inibir o edema de orelha induzido pela capsaicina. Entretanto, quando o R-715 foi aplicado topicamente o antagonista falhou em inibir o edema. Apesar da divergência com o estudo anterior, o resultado obtido sugere que os antagonistas peptídicos não são capazes de atravessar a barreira cutânea devido a sua estrutura molecular. Assim sendo, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas não-peptídicos oferecem uma grande oportunidade para a geração de novos medicamentos porque geralmente os que são peptídicos apresentam pobre biodisponibilidade quando administrados por via oral ou sistêmica (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

Com base no resultado anterior, usando os antagonistas peptídicos clássicos dos receptores das cininas e o R-715 administrados por via intraperitoneal, pode-se sugerir que os dois receptores para as cininas estão presentes na pele e participam de maneira importante na resposta da inflamação neurogênica local. A importância desses dados é que sugerem uma nova aplicação para os antagonistas das cininas na clínica dermatológica. No tratamento de doenças da pele, as drogas usadas por via sistêmica causam muitos efeitos colaterais dificultando a adesão dos pacientes ao tratamento. Nesse sentido, a via tópica é uma alternativa muito eficaz para a terapêutica de doenças cutâneas. Apesar do resultado de Mantione e Rodrigues (1990), os antagonistas peptídicos apresentam dificuldade de absorção pela pele devido ao alto peso molecular apresentado por essas moléculas, dificultando seu uso tópico. Assim, a etapa seguinte foi estudar, no mesmo modelo, antagonistas não-peptídicos SSR 240612 e o FR 173657 por via tópica. Nessas condições, os dois antagonistas foram significativamente eficazes em inibir o edema induzido pela capsaicina, semelhante aos resultados observados com os antagonistas clássicos por via sistêmica. Entretanto, quando os antagonistas não-peptídicos foram co-administrados não houve efeito aditivo na inibição do edema induzido pela capsaicina (52% de inibição). Os resultados obtidos com os antagonistas não-peptídicos confirmam que os dois receptores das cininas estão presentes localmente e participam da resposta inflamatória neurogênica induzida pela capsaicina. Além disso,

estes dados são bastante relevantes porque este é o primeiro estudo a demonstrar o efeito desses novos antagonistas não-peptídicos aplicados topicamente em um processo inflamatório da pele.

Gougat *et al.* (2004) demonstraram que o SSR 240612 apresenta alta afinidade pelo subtipo do receptor B₁ da BK em humanos, coelhos e ratos, através de experimentos de ligação específica. Os mesmos autores mostraram também que o SSR 240612 (0,3 - 30 mg/kg; v.o.) inibiu de forma significativa e dependente da dose o edema de pata induzido pela capsaicina. Costa *et al.* (2006) evidenciaram que o SSR 240612 apresenta propriedades antiinflamatórias sistêmicas quando analisado no modelo de pleurisia induzido por carragenina em camundongos. Além disso, também foi capaz de reduzir a migração celular quando administrado por via oral (COSTA *et al.*, 2006). Também foi verificado que o SSR 240612 apresenta atividade anti-hiperalgésica e antiinflamatória quando administrado em ratos e camundongos por via oral e atualmente encontra-se na fase pré-clínica de estudo como antiinflamatório e para o tratamento da dor neurogênica (BOCK *et al.*, 2003; LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que o antagonista não-peptídico do receptor B₂, FR 173657, apresenta alta seletividade e afinidade pelo receptor B₂. Além disso, este antagonista foi um dos primeiros a apresentar atividade por via oral em modelos de broncoconstrição em cobaias e vários modelos de edema, inflamação e dor (ASANO *et al.*, 1999; LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). Assim, o FR 173657 tem se mostrado uma importante ferramenta para investigar a fisiologia e patofisiologia da BK (LEE-LUNBERG *et al.*, 2005).

Para complementar os resultados obtidos com os antagonistas e para melhor compreensão do papel das cininas nos processos inflamatórios da pele, foram utilizados animais nocaute para os receptores, como mais uma ferramenta experimental. No entanto, a deleção do receptor B₁ e a do receptor B₂ não foi capaz de alterar o edema de orelha induzido pela capsaicina. O resultado pode ser explicado por uma possível atuação dos dois receptores em conjunto nos processos inflamatórios cutâneos neurogênicos, ou talvez uma possível compensação de um receptor na ausência do outro receptor. Já foi demonstrado que os animais nocaute para o receptor B₂ apresentam aumento da expressão do receptor B₁ (MADEDDU *et al.*, 1997; DUKA *et al.*, 2001; CAYLA *et al.*, 2007) e esta compensação verificada pode explicar a ausência de alteração na resposta

edematogênia da capsaicina nos animais com deleção de um único receptor B₁ ou B₂. Para tentar esclarecer melhor este resultado, foi feito o tratamento com o Hoe 140 (antagonista do receptor B₂) no animal nocaute para o receptor B₁ e com o R-715 (antagonista do receptor B₁) no animal nocaute para o receptor B₂, e em ambos os casos os animais apresentaram redução significativa do edema induzido pela capsaicina. Esses resultados confirmam que, quando o animal não tem o receptor B₁, a presença única do receptor B₂ é suficiente para manutenção da resposta neurogênica via ativação do TRPV1. O contrário também é verdadeiro, ou seja, quando o animal é nocaute para o receptor B₂, o receptor B₁ deve estar constitutivamente presente e funcionando, de modo a compensar a ausência do B₂. Já quando foi administrado o R-715 (antagonista do receptor B₁) nos animais nocaute para o receptor B₁ e o Hoe 140 (antagonista do receptor B₂) nos animais nocaute para o receptor B₂, não houve modificação na resposta da capsaicina. Esses dados confirmam que ambos os receptores estão ausentes nos animais nocaute e que não há atuação inespecífica dos antagonistas. Contudo, em contrário aos dados com os animais nocaute para um subtipo de receptor, os animais duplo nocaute apresentaram redução do edema induzido pela capsaicina. Esses resultados sugerem uma ação seletiva de cada antagonista peptídico e confirmam a existência do balanço fisiológico entre os receptores das cininas e sua participação nas respostas inflamatórias da pele.

Até o momento os resultados mostram que as cininas participam na inflamação neurogênica mediada pela capsaicina por meio de ambos os receptores B₁ e B₂ presentes na pele. Como relatado anteriormente, a ativação do receptor TRPV1 nos queratinócitos induz a elevação de cálcio intracelular o que resulta na produção de mediadores pró-inflamatórios (SOUTHALL *et al.*, 2003). Portanto, é possível que as cininas possam ser produzidas e liberadas pelos queratinócitos de uma maneira cálcio-dependente em resposta a ativação do receptor TRPV1 pela capsaicina. Como uma possível hipótese, as cininas poderiam ser produzidas e liberadas dos queratinócitos como uma resposta secundária a ativação do TRPV1 pela capsaicina. Em uma etapa subsequente, as cininas formadas poderiam atuar nos neurônios sensoriais da pele, ocasionando a liberação de neuropeptídeos e assim contribuiriam para o aumento da inflamação neurogênica. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar como as cininas são formadas em resposta a capsaicina.

Outro resultado importante encontrado no modelo da capsaicina foi a atividade tópica significativa apresentada pelos antagonistas não-peptídicos neste modelo. Este resultado pode ser clinicamente relevante uma vez que uma ampla variedade de doenças inflamatórias inclui um componente neurogênico como a dermatite, a psoríase e a alopecia aerata (PLANELLS-CASES *et al.*, 2005; PETERS *et al.*, 2006).

Outro modelo utilizado para avaliar o papel das cininas foi o modelo do edema induzido pelo ácido araquidônico (AA). O edema induzido pelo AA, sendo este o precursor dos eicosanóides, resulta na rápida produção (pico de concentração em 15 min) de PGE₂ e LTC₄/D₄. Estes mediadores são capazes de promover vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e podem atuar sinergicamente na produção do edema. Além disso, compostos com capacidade de inibir a lipoxigenase são geralmente mais efetivos contra o edema induzido pelo AA, enquanto compostos que inibem a ciclooxigenase são mais efetivos contra o edema induzido pelo TPA. Muito pouco de LTB₄ está presente nas orelhas tratadas com AA, ao contrário da aplicação com o TPA. O LTB₄ promove inflamação por indução do acúmulo de leucócitos, ativação dos leucócitos e modulação da dor. Os neutrófilos migram para a derme da orelha em 30 min após a administração de AA com pico máximo em 1 h, quando o edema é máximo (CARLSON *et al.*, 1985).

Os dois antagonistas testados sistemicamente, Hoe 140 e o R-715, só foram capazes de inibir o edema induzido pelo AA quando utilizados em associação. Já os antagonistas não-peptídicos aplicados topicamente reduziram significativamente o edema do AA quando em tratamento separado ou quando co-administrados. Assim, neste modelo de inflamação de pele, os dois receptores das cininas parecem ter pequena, mas significativa participação. No entanto, a inibição observada com a co-aplicação novamente não sugere efeito somatório ou sinérgico dos antagonistas, resultado similar ao obtido no modelo da capsaicina. Os animais nocaute vieram novamente a confirmar esta conclusão, uma vez que somente os animais duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) apresentaram redução na formação do edema de orelha em resposta a aplicação tópica do AA. Como relatado anteriormente, é postulado que diversos estímulos desencadeiam uma resposta inflamatória cutânea por induzirem diretamente os queratinócitos da epiderme a elaborar específicos mediadores pró-inflamatórios como a BK. Portanto, o modelo inflamatório do AA pode estar induzindo a liberação de BK dos queratinócitos, contribuindo para esta resposta edematogênica. Carlson *et al.* (1985) relata que os metabólitos do AA são

provavelmente produzidos pela população de células residentes como os queratinócitos e células endoteliais vasculares. Além disso, os neutrófilos migram para a derme da orelha após a administração de AA e os neutrófilos contêm o sistema completo para a síntese e liberação de cininas bioativas (CARLSON, 1985; BOCKMANN e PAEGELOW, 2000). Nas células inflamatórias das doenças de pele, os neutrófilos atraídos por citocinas são fonte de cininogênio (SCHREMMER-DANNINGER *et al.*, 2004). Portanto, é possível que o estímulo inflamatório ocasione a liberação de cininas dos neutrófilos que migram para a derme, controlando a permeabilidade vascular (BOCKMANN e PAEGELOW, 2000). Além disso, com estes resultados podemos complementar que a ação das cininas (aumentando a permeabilidade vascular) deve ser pela ativação dos dois receptores cininérgicos presentes, B₁ e B₂. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo pelo qual as cininas participam no modelo do AA.

Dando continuidade a avaliação do sistema das cininas na pele, outro modelo de inflamação utilizado foi a indução do edema pela aplicação de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o TPA. Os ésteres de forbol, como o TPA, induzem inflamação cutânea e respostas hiperproliferativas nos animais. O TPA ativa diversas isoformas da PKC, que por sua vez ativam outros grupos de enzimas como as fosfolipases e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). A ativação das MAPK por sua vez, induz a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B e o AP-1, os quais regulam a produção de diversas substâncias pró-inflamatórias (SANCHEZ e MORENO, 1999; SHOLZEN *et al.*, 2003). Todavia, o mecanismo pelo qual o TPA causa inflamação ainda não está completamente claro, mas parece também estar relacionado em parte com a liberação de eicosanóides. Inibidores da biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas têm se mostrados ativos neste modelo. Já é bem estabelecido que o TPA estimula a fosfolipase A₂, resultando na liberação de AA e conseqüentemente a produção de prostaglandinas e leucotrienos (principalmente LTB₄) (GÁBOR, 2000).

Todos os antagonistas cininérgicos testados, tanto bloqueadores dos receptores B₁ (des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK e SSR 240612) quanto dos receptores B₂ (Hoe 140 e FR 173657), administrados por via intraperitoneal (peptídicos) ou tópica (não-peptídicos) falharam em inibir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA. A realização do mesmo modelo experimental usando os animais nocaute para os receptores das cininas

confirmou o fato de nenhum dos dois receptores estarem envolvidos nesta resposta inflamatória cutânea. Sendo assim, esses resultados demonstram que as cininas não estão criticamente envolvidas na indução do edema no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pelo éster de forbol. Embora alguns estudos tenham sugerido a participação dos neuropeptídeos (substância P, CGRP e somatostatina) na resposta inflamatória induzida pelo óleo de cróton (LAHANN, 1986; GUTWALD *et al.*, 1991), estudos mais recentes tem apresentado resultados opostos (SCHOLZEN *et al.*, 2001; 2003). Usando animais nocaute para a endopeptidase neutra e para a enzima conversora de angiotensina, os autores descrevem uma ausência de neuropeptídeos no modelo induzido pelo óleo de cróton, mas não nas respostas alérgicas da pele. Estes últimos estudos podem explicar a ausência da participação dos receptores das cininas no modelo do TPA, devido às cininas estarem relacionadas com as respostas neurogênicas (como verificado neste estudo). Curiosamente, os animais nocaute para o receptor B₁, para o receptor B₂ e duplo nocaute apresentaram redução do influxo de neutrófilos para a derme induzido pelo TPA, sendo esta redução mais significativa nos animais com deleção do receptor B₂. Bockmann e Paegelow (2000) relatam que comparado com outros fatores quimiotáticos a BK induz somente moderada migração dos neutrófilos periféricos. Os autores ainda comentam que a migração pode ser inibida pelo Hoe 140, sugerindo que a quimiotaxia induzida pela BK é mediada pelo receptor B₂. Em doenças inflamatórias cutâneas a promoção da diminuição da migração é um efeito interessante porque o acúmulo de neutrófilos no tecido é crítico. Além disso, o acúmulo de leucócitos induzido pela aplicação de TPA é necessário para a progressão da reação inflamatória, assim como para o aumento da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (OTUKI *et al.*, 2005).

Entretanto, no modelo de inflamação cutânea crônica utilizando o mesmo agente irritante (aplicação múltipla de TPA), os animais selvagem, nocaute para o receptor B₁, nocaute para o receptor B₂ e duplo nocaute foi observada alteração significativa na resposta inflamatória da pele. Esse modelo de inflamação crônica cutânea é mais importante para avaliar compostos antiinflamatórios do que o modelo agudo, isso porque os compostos são aplicados após o estabelecimento da lesão inflamatória. A aplicação múltipla de TPA na orelha dos animais induz respostas inflamatórias prolongadas, hiperplasia epidermal e infiltração de neutrófilos (GÁBOR, 2000). Comparando o edema nos animais selvagem ocasionado pelo estímulo crônico, os animais nocaute para o

receptor B_2 apresentaram aumento mais acentuado na espessura da orelha. É interessante destacar que a medida do edema de orelha foi interrompida no quinto dia para os animais nocaute para o receptor B_2 devido à hiperproliferação intensa apresentada por estes animais, o que dificultou a medida do edema com o auxílio do micromêtro. Entretanto, a determinação do peso das orelhas ao final do estímulo crônico serviu como uma medida a confirmar os resultados do edema, ou seja, mostrando o aumento significativo do edema nos animais nocaute para o receptor B_2 , bem como a ausência de efeito nos animais duplo nocaute e nocaute para B_1 . Esses resultados são um forte indicativo que na resposta crônica do TPA, o sistema das cininas provavelmente está participando no processo de proliferação celular epidérmica. Este fato pode ser visualizado nas fotos pela aparência das orelhas estimuladas cronicamente, comparando-se os animais nocaute e selvagem.

Assim, o próximo passo foi avaliar a hiperproliferação celular ocasionada pela aplicação de TPA através de avaliação histológica. Esta análise mostrou que ocorreu aumento da hiperplasia epidermal gerada pelo éster de forbol crônico nos animais selvagem e nocaute para os receptores das cininas. Entretanto, os animais nocaute tanto para o receptor B_2 quanto para o receptor B_1 apresentaram hiperplasia epidermal mais intensa com projeção da epiderme em direção a derme, processo denominado de acantose, indicando aumento maior na proliferação celular nestes animais quando comparado com os animais controle (selvagem). Curiosamente, os animais duplo nocaute apresentaram hiperplasia epidermal menor, com redução na formação de acantoses, quando comparado com todos os outros grupos, indicando possivelmente menor proliferação celular com a deleção de ambos os receptores das cininas.

A hiperplasia epidermal é uma característica marcante da psoríase, a qual é uma das mais comuns doenças de pele humana. Histologicamente, a psoríase tem aparência definida, com intenso espessamento da epiderme devido ao aumento de proliferação dos queratinócitos na epiderme interfolicular e a estrutura da epiderme torna-se muito alongada com ondulações, formando longas projeções para dentro da derme (acantose). A diferenciação dos queratinócitos na psoríase é extensivamente alterada, apresentando programação alternativa de diferenciação celular, a qual está transitoriamente expressa durante o processo de cicatrização. As placas psoríáticas apresentam escamas na superfície, que são ocasionadas pela diferenciação terminal aberrante dos queratinócitos.

A camada granular da epiderme, onde começa a diferenciação terminal, é grandemente reduzida ou está ausente nas lesões psoriáticas. Conseqüentemente, o estrato córneo na pele psoriática é formado de queratinócitos que não estão completamente diferenciados e que erroneamente apresentam células nucleadas (paraqueratose). Outra característica histológica da psoríase inclui a presença de neutrófilos em pequenos focos dentro do estrato córneo e significativa infiltração de mononucleares na epiderme (LOWES *et al.*, 2007). Portanto, a psoríase é uma desordem caracterizada por inflamação crônica acompanhada por alterações na proliferação e diferenciação dos queratinócitos, assim como respostas teciduais inflamatórias e angiogênicas que incluem vasto influxo de células T, macrófagos e células dendríticas. Estas respostas geram ativação acentuada de citocinas que complementam o infiltrado celular, que em conjunto gera ativação de mediadores solúveis e constituintes celulares que levam ao surgimento das grossas placas escamosas na pele, característica da psoríase (NICKOLOFF *et al.*, 2006).

O TPA, agente flogístico utilizado em múltipla aplicação nesse estudo, induz inflamação na pele e respostas hiperproliferativas nos animais, o que em muitos aspectos se assemelha com as doenças de pele como a psoríase (GÁBOR, 2000). Os resultados das análises histológicas confirmam a presença das respostas hiperproliferativas e demonstram que nos animais nocaute para apenas um dos receptores das cininas ocorre aumento da proliferação celular e nos animais nocaute para ambos os receptores ocorre diminuição da proliferação. Com a finalidade de confirmar a participação das cininas no processo de proliferação dos queratinócitos epidermais foram avaliados os níveis de expressão da proteína PCNA. A síntese e expressão do PCNA estão relacionadas ao estado proliferativo das células e a expressão dessa proteína aumenta durante a fase G₁, com pico na fase S e declínio durante a fase G₂/M do ciclo celular (GAMBICHLER *et al.*, 2008). Os resultados mostram que houve aumento na expressão do PCNA quando são comparados os animais nocaute para o receptor B₂ com os animais selvagem. Porém, os animais duplo nocaute (B₁B₂^{-/-}) apresentaram redução significativa nos níveis de expressão do PCNA, indicando que a ausência dos dois receptores para as cininas é capaz de interferir negativamente com a resposta de hiperproliferação de queratinócitos da epiderme. Este resultado foi confirmado pelas duas técnicas empregadas: western blot e imunohistoquímica. Além disso, na avaliação por imunohistoquímica o resultado demonstra claramente que as características histológicas, hiperplasia epidermal e

acantose, são similares as encontradas na psoríase e que a deleção de ambos os receptores ocasiona diminuição destes parâmetros.

Portanto, a presença constitutiva dos receptores B₁ e B₂ na pele pode estar contribuindo para a indução da proliferação celular nas doenças de pele, como a psoríase que apresenta como característica o aumento da proliferação celular. É postulado que diversos estímulos desencadeiam uma resposta inflamatória cutânea por diretamente induzir os queratinócitos da epiderme a elaborar mediadores específicos pró-inflamatórios como a BK. Nos queratinócitos a BK induz o *turnover* de fosfatidilinositol, formação de diacilglicerol, fosforilação de tirosina e crescimento celular (SCHREMMER-DANNINGER *et al.*, 1995; TALWAR *et al.*, 1990; WEISS e ATLAS, 1991; ROSENBAACH *et al.*, 1993). Schremmer-Danninger *et al.* (1995) demonstraram que os receptores B₂ da BK estão presentes nos queratinócitos mitoticamente ativos da camada basal e que este dado suporta a idéia de que a BK atua como agente mitogênico. Estes receptores podem mediar os efeitos das cininas relacionados à proliferação dos queratinócitos após as condições inflamatórias. Em um estudo posterior os mesmos autores relatam que as cininas exercem amplo espectro de efeitos fisiológicos e também patofisiológicos incluindo a proliferação celular (SCHREMMER-DANNINGER *et al.*, 1999). Os mesmos autores também demonstram que os receptores B₁ estão constitutivamente expressos na pele normal e que em biópsias da pele psoriática humana o cininogênio de baixo peso molecular esta expresso, mas não o cininogênio de alto peso molecular. Continuando esses trabalhos, Schremmer-Danninger *et al.* (2004) demonstraram a marcação específica para as proteínas do receptor B₂ nos queratinócitos da camada basal da epiderme e nos fibroblastos da derme na pele humana normal. De forma similar, o presente trabalho demonstra, por meio da técnica de imunohistoquímica, uma marcação para a proteína PCNA mais intensa na camada basal da epiderme dos animais nocaute para os receptores das cininas indicando que a proliferação celular nestes animais está mais relacionada com a camada basal da pele.

Vários autores sugerem que as cininas promovem a proliferação celular, como em células germinativas e em cultura de queratinócitos da córnea de coelhos (CHENG, 2004; ATANASSOVA, 2003; BHOOLA *et al.*, 1992). No entanto, existem resultados que são contraditórios e afirmam que as cininas não induzem a proliferação celular (JOHNSON *et al.*, 1992; JUNG *et al.*, 1999; VIDAL *et al.*, 2005; COUTANT e RYDER, 1996), inclusive

quanto ao efeito da BK especificamente sobre a proliferação de queratinócitos (JOHNSON *et al.*, 1992; TALWAR *et al.*, 1990). Entretanto, todos os trabalhos citados foram realizados “*in vitro*” utilizando linhagens de queratinócitos em cultura ou amostras de pele obtidas de placas psoriáticas humanas. Portanto, os resultados encontrados complementam os estudos anteriores através da utilização de um modelo “*in vivo*”, na tentativa de tentar esclarecer as ações das cininas na pele.

Plobete *et al.* (1991) demonstraram que na pele psoriática humana verifica-se a presença de neutrófilos imunorreativos para calicreína tecidual na epiderme e nas escamas psoriáticas. Além disso, os autores relatam que o cininogênio está aumentado na psoríase e que as cininas apresentam ação mitogênica estimulando a síntese de DNA e a divisão celular e que essa ação pode contribuir em alguma extensão para o *turnover* acelerado das células da epiderme na psoríase. Os autores ainda comentam a possibilidade das cininas contribuírem para a patogênese da psoríase e que antagonistas das cininas aplicados topicamente podem apresentar valor terapêutico. Dessa forma, as cininas devem estar participando na indução da hiperproliferação celular que ocorre na psoríase e os resultados indicam que ambos os receptores, B₁ e B₂ estão envolvidos no processo de proliferação, sendo que a deleção de apenas um receptor provavelmente está interferindo no balanço fisiológico dos receptores das cininas no controle do “*turnover*” celular e desencadeando aumento excessivo da proliferação como observado nos animais nocaute para apenas um dos receptores. Entretanto, a deleção dos dois receptores ocasiona melhora do processo hiperproliferativo. Portanto, para confirmar se a inibição dos receptores das cininas ocasiona melhora clínica das doenças proliferativas e com o intuito de buscar novas estratégias terapêuticas para o tratamento destas doenças, a próxima etapa foi avaliar os antagonistas não-peptídicos SSR 240612 e FR 173657 no modelo de inflamação crônica induzido pelo TPA. Como mostrado nos resultados todos os antagonistas não-peptídicos avaliados inibiram de forma significativa o edema causado pela aplicação crônica de TPA, os resultados foram significativos tanto na medida do edema com o auxílio do micrômetro e na determinação do peso das orelhas ao final do tratamento. A associação dos antagonistas (SSR + FR) não promoveu efeito aditivo na inibição do edema indicando mais uma vez que os receptores das cininas podem estar atuando em conjunto nas respostas proliferativas. A análise histológica confirma este efeito dos antagonistas não-peptídicos promovendo redução do edema e da hiperplasia

epidermal, sendo possível visualizar estes efeitos macroscopicamente pelas fotos das orelhas ao final do experimento. Ainda neste mesmo modelo, o tratamento com os antagonistas não-peptídicos não foi capaz de alterar a quantidade de leucócitos no tecido ou a atividade das enzimas MPO e NAG, indicando, portanto que os antagonistas não são capazes de interferir na migração celular neste modelo.

Portanto, o presente estudo apresenta resultados sobre a participação dos receptores das cininas em diferentes processos inflamatórios por meio de diferentes modelos de inflamação cutânea em animais. Os resultados mostram que o sistema das cininas está presente na organização da pele participando da resposta inflamatória local gerada por diferentes agentes flogísticos. Os receptores se mostraram envolvidos na resposta edematogênica, na migração de leucócitos e na hiperproliferação da epiderme. Alguns estudos anteriores relatam a participação das cininas nas doenças inflamatórias cutâneas, entretanto o presente estudo mostrou uma nova possibilidade de aplicação clínica dos antagonistas cininérgicos não-peptídicos, SSR 240612 e FR 173657, os quais mostraram ser muito seletivos e potentes “*in vivo*” quando utilizados pela via tópica. Estes resultados criam uma nova alternativa para o tratamento local das doenças inflamatórias cutâneas, principalmente as doenças que apresentam um componente neurogênico e/ou processo hiperproliferativo.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O presente estudo mostrou que as cininas apresentam participação importante em diferentes processos inflamatórios na pele.
- ✓ Os resultados obtidos demonstraram que as cininas estão envolvidas na inflamação neurogênica cutânea mediada pela capsaicina e na resposta inflamatória gerada pelo ácido araquidônico na pele.
- ✓ Não pode ser detectada a participação dos receptores das cininas no edema induzido pela aplicação aguda de TPA, entretanto foi verificada uma diminuição na migração de leucócitos nos animais com deleção de um receptor ou de ambos.
- ✓ No modelo de inflamação crônica induzida pelo TPA os resultados demonstraram que as cininas estão envolvidas no processo de proliferação e na indução do aumento da hiperplasia epidermal. Os animais duplo nocaute apresentaram redução significativa nos níveis de expressão do PCNA indicando que a ausência dos dois receptores para as cininas é capaz de interferir negativamente com a resposta de hiperproliferação de queratinócitos da epiderme.
- ✓ Além disso, a deleção de apenas um receptor provavelmente está interferindo no balanço fisiológico dos receptores das cininas no controle do *turnover* celular e desencadeando um aumento excessivo da proliferação como observado nos animais nocaute para apenas um dos receptores.
- ✓ Os antagonistas não-peptídicos, SSR 240612 e FR 173657, apresentaram significativa atividade tópica na resposta induzida pela capsaicina e na resposta induzida pela aplicação múltipla de TPA, tornando clinicamente relevante o uso destes antagonistas como novas estratégias terapêuticas para o tratamento das doenças inflamatórias cutâneas.

7 REFERÊNCIAS

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. **Immunopharmacology**. 35(1):23-6, 1996.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M.; TRAUTMANN, A.; BLASER, K. Immune regulation in atopic dermatitis. **Curr Opin Immunol**. 12(6):641-6, 2000.

ANGERS, M.; DROUIN, R.; BACHVAROVA, M.; PARADIS, I.; MARCEAU, F.; BACHVAROV, D. R. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. **J Cell Biochem**. 78(2):278-96, 2000.

ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G. A. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: imunomoduladores biológicos. **An bras Dermatol**. 79(4):393-408, 2004.

ASANO, M.; INAMURA, N.; HATORI, C.; SAWAI, H.; FUJIWARA, T.; ABE, Y.; KAYAKIRI, H.; SATOH, S.; OKU, T.; NAKAHARA, K. Discovery of orally active nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonists. **Immunopharmacology**. 43(2-3):163-8, 1999.

ATANASSOVA, N. N. B2 bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation in vitro. **Andrologia**. 35(1):13-6, 2003.

ATHAR, M.; AN, K. P.; TANG, X.; MOREL, K. D.; KIM, A. L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. **Toxicol Appl Pharmacol**. 195(3):370-8, 2004.

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(3):1623-30, 1995.

BACHVAROV, D. R.; HESS, J. F.; MENKE, J. G.; LARRIVEE, J. F. E.; MARCEAU, F. Structure and genomic organization of the human B₁ receptor gene for kinins (BDKRB1). **Genomics**. 33(3): 374-81, 1996.

BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discov Today**. 4(10):472-79,1999.

BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D. E.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**. 44(1):1-80, 1992.

BLAUKAT, A.; HERZER, K.; SCHROEDER, C.; BACHMANN, M.; NASH, N.; MULLER-ESTERL, W. Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. **Biochemistry**. 38(4):1300-9, 1999.

BOCK, M. G.; HESS, J. F.; PETTIBONE, D. J. Section III. **Inflammatory, pulmonary and gastrointestinal diseases**, in Annual Reports in Medicinal Chemistry (Doherty A ed). New York: Academic Press, vol. 38, pp 111-120, 2003.

BÖCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. **J Leukoc Biol**. 68(5):587-92, 2000.

BORKOWSKI, J. A.; RANSON, R. W., SEABEROOK, G. R.; TRUMBAUER, M.; CHEN, H.; HILL, R. G.; STRADER, C. D.; HESS, J. F. Target disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminated bradykinin action in smooth muscle and neurons. **J Biol Chem**. 270(23):13706-10, 1995.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**. 78(3):206-9, 1982.

BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discov Today**. 2(8):235-332, 1997.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J. E.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. 87(1):1-5, 2000.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anaesthesiol**. 14(5):519-26, 2001.

CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D. A.; CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**. 143(7):803-18, 2004.

CAMPOS, M. M.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **Trends Pharmacol Sci**. 27(12):646-51, 2006.

CAO, T.; BRAIN, S. D.; KHODR, B.; KHALIL, Z. B1 and B2 antagonists and bradykinin-induced blood flow in rat skin inflammation. **Inflamm Res**. 51(6):295-9, 2002.

CARLSON, R.P.; ONEIL, L.D.; CHANG, J.; LEWIS, A. J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents Actions**. 17(2):197-204, 1985.

CAUWENBERGH, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. **Clin Dermatol**. 20(5):467-73, 2002.

CAYLA, C.; MERINO, V. F.; CABRINI, D. A.; SILVA JR, J. A.; PESQUERO, J. B.; BADER, M. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. **Int Immunopharmacol**. 2(13-14):1721-7, 2002.

CAYLA, C.; TODIRAS, M.; ILIESCU, R.; SAUL, V. V.; GROSS, V.; PILZ, B.; CHAI, G.; MERINO, V. F.; PESQUERO, J. B.; BALTATU, O. C.; BADER, M. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. **FASEB J.** 21(8):1689-98, 2007.

CEEA, 2003. **Comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná.** Disponível em: <<http://www.bio.ufpr.br/ceea/html/index.html>>. Acesso em: 15 abril, 2005.

CHANG, J., CARLSON, R.P., O'NEILL-DAVIS, L., LAMB, B., SHARMA, R.N., LEWIS, A.J. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. **Inflammation.** 10(3):205-14, 1986.

CHENG, C. Y.; HUANG, S. C.; HSIAO, L. D.; SUN, C. C.; JOU, M. J.; YANG, C. M. Bradykinin-stimulated p42/p44 MAPK activation associated with cell proliferation in corneal keratocytes. **Cell Signal.** 16(5):535-49, 2004.

COSTA, R.; FERNANDES, E. S.; MENEZES-DE-LIMA O, J. R.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides.** 27(11):2967-75, 2006.

COSTA-NETO, C. M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T. A.; PARREIRAS-e-SILVA, L. T.; PEREIRA, M. G.; REIS, R. I.; SOUZA, P. P. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **Int Immunopharmacol.** 8(2):135-42, 2008.

COUTANT, K. D.; RYDER, N. S. Bradykinin upregulates immediate-early gene mRNA in human keratinocytes. **Arch Dermatol Res.** 288(1):2-6, 1996.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents Actions.** 20(1-2):69-76,1987.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol.** 19(5):573-85, 2001.

DEMERJIAN, M.; MAN, M. Q.; CHOI, E. H.; BROWN, B. E.; CRUMRINE, D.; CHANG, S.; MAURO, T.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Topical treatment with thiazolidinediones, activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, normalizes epidermal homeostasis in a murine hyperproliferative disease model. **Exp Dermatol.** 15(3):154-60, 2006.

DENDA, M. F.; FUZIWARA, S.; INOUE, K.; DENDA, S.; AKAMATSU, H.; TOMITAKA, A.; MATSUNAGA, K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. **Biochem Biophys Res Commun.** 285(5):1250-2, 2001.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol.** 36(7):1141-6, 2004.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions.** 26(3-4):335-41, 1989.

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R. A. S.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. **Therapeutics Focus.** 4(5):222-231, 1999.

DUKA, I.; KINTSURASHVILI, E.; GAVRAS, I.; JOHNS, C.; BRESNAHAN, M.; GAVRAS, H. Vasoactive potential of the B(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. **Circ Res.** 88(3):275-81, 2001.

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(2-3):291-8, 1998.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D. T. **The Biology of the Skin**. Lancaster: Parthenon, 2001.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GABOR, M.; RAZGA, Z. Influence of nonsteroidal antiphlogistics on mouse ear inflammation induced with croton oil. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. 299:241-6, 1989.

GAMBICHLER, T.; BISCHOFF, S.; BECHARA, F. G.; ALTMAYER, P.; KREUTER, A. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. **J Dermatol Sci**. 49(2):125-32, 2008.

GNIADOCKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **Gen Pharmacol**. 30(5):619-22, 1998.

GOBEIL, F. JR.; CHARLAND, S.; FILTEAU, C.; PERRON, S. I.; NEUGEBAUER, W.; REGOLI, D. Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. **Hypertension**. 33(3):823-9, 1999.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GORDON, K. B.; MCCORMICK, T. S. Evolution of biologic therapies for the treatment of psoriasis. **Skinmed**. 2(5):286-94, 2003.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Drug Discov**. 4(1):19-34, 2005.

GOUGAT, J.; FERRARI, B.; SARRAN, L.; PLANCHENAU, C.; PONCELET, M.; MARUANI, J.; ALONSO, R.; CUDENNEC, A.; CROCI, T.; GUAGNINI, F.; URBAN-SZABO, K.; MARTINOLLE, J. P.; SOUBRIÉ, P.; FINANCE, O.; GÉRARD, L. F. SSR

240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-((6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl)amino)propanoyl)amino]-3-(4-([2R,6S]-6-methylpiperidinyl)methyl)phenyl)-N-isopropyl-Nmethylpropanamide hydrochloride], to New Nonpeptide Antagonist of the Bradykinin B1 Receptor : Biochemical and Pharmacological Characterization. **J Pharmacol Exp Ther.** 309(2):661-9, 2004.

GUTWALD J, GOEBELER M, SORG C. Neuropeptides enhance irritant and allergic contact dermatitis. **J Invest Dermatol.** 96(5):695-8, 1991.

HALL, J. M.; MORTON, I. K. M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG, editor. **The handbook of immunopharmacology: the kinin system**, London: Academic Press, pp. 9-43, 1997.

HESS, J. F.; BORKOWSKI, J.A.; YOUNG, G. S.; STRADER, C. D.; RANSOM, R. W. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem Biophys Res Commun.** 184(1):260-8, 1992.

HESS, J. F.; HEY, P. J.; CHEN, T. B.; O'BRIEN, J.; OMALLEY, S. S.; PETTIBONE, D. J.; CHANG, R. S. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. **Biol Chem.** 382(1):123-9, 2001.

INOUE, K.; KOIZUMI, S.; FUZIWARA, S.; DENDA, S.; INOUE, K.; DENDA, M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 291(1):124-9, 2002.

JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J. M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, R.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J Neurocytol.** 10(6):963-80, 1981.

JEAN, J.; LAPOINTE, M.; SOUCY, J.; POULIOT, R. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. **J Dermatol Sci.** 53(1):19-25, 2009.

JOHNSON, R. M.; KING, K. L.; MORHENN, V. B. Comparison of second messenger formation in human keratinocytes following stimulation with epidermal growth factor and bradykinin. **Second Messengers Phosphoproteins.** 14(1-2):21-37, 1992.

JUNG, E. M.; BETANCOURT-CALLE, S.; MANN-BLAKENEY, R.; GRINER, R. D.; BOLLINGER BOLLAG, W. Sustained phospholipase D activation is associated with keratinocyte differentiation. **Carcinogenesis.** 20(4):569-76, 1999.

KOZLOWSKI, M. R.; ROSSER, M. P.; HALL, E.; LONGDEN, A. Effects of bradykinin on PC-12 cell differentiation. **Peptides.** 10(6):1121-6, 1989.

LAHANN, T. R. Effect of capsaicin on croton oil and TPA induced tumorigenesis and inflammation. **Proc West Pharmacol Soc.** 29:145-9, 1986.

LAMB, M. E.; DE WEERD, W. F.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. **Biochem J.** 355(3):741-50, 2001.

LEEB-LUNDBERG, F.L.M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. **Pharmacol Rev.** 57(1):27-77, 2005.

LEUNG, D. Y.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M. D.; NOMURA, I.; HAMID, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **J Clin Invest.** 113(5):651-7, 2004.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochem Pharmacol.** 31;50(3):347-53, 1995.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**. 445(7130):866-73, 2007.

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**. 15;23(2):362-9, 1994.

MADEDDU, P.; VARONI, M. V.; PALOMBA, D.; EMANUELI, C.; DEMONTIS, M. P.; GLORIOSO, N.; DESSÌ-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; ANANIA, V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. **Circulation**. 96(10):3570-8, 1997.

MANTIONE, C. R.; RODRIGUEZ, R. A bradykinin (BK)₁ receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **Br J Pharmacol**. 99(3):516-8, 1990.

MARCEAU, F.; BACHVAROV, D. R. Kinin receptors. **Clin Rev Allergy Inflamm**. 16(4):385-401, 1998.

MARCEAU, F.; HESS, J. F. E.; BACHVAROV, D. R. The B₁ receptors for kinins. **Pharmacol Rev**. 50(3):357-86, 1998.

MARCEAU F.; REGOLI D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 3(10):845-52, 2004.

MATHIS, S. A.; CRISCIMAGNA, N. L.; LEEB-LUNDBERG, L. M. F. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**. 50(1):128-39, 1996.

MATUS, C. E.; EHRENFELD, P.; PAVICIC, F.; SARMIENTO, J. M.; ASTROZA, A.; SANCHEZ, T.; SALEM, C.; CONCHA, M.; VIDAL, M. A.; GONZALEZ, C. B.; FIGUEROA, C. D. Activation of kinin B receptor triggers differentiation of cultured human keratinocytes. **Br J Dermatol**. 159(4):792-803, 2008.

MCEACHERN, A. E.; SHELTON, E. R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKI, J.; ALDRICH, R. W.; JARNAGIN, K. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88(17):7724-8, 1991.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol.** 559(2-3):227-35, 2007.

MENDONÇA, C. O. e BURDEN, A. D. Current concepts in psoriasis and its treatment. **Pharmacol Ther.** 99(2):133-147, 2003.

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(34):21583-6, 1994.

MODÉER, T.; ANDUREN, I.; YUCEL-LINDBERG, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumor necrosis factor alpha. **Cytokines.** 10(1):26-31, 1998.

MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N. J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci.** 99(1):6-38, 2005.

MORI, M. A.; BADER, M.; PESQUERO, J. B. Genetically altered animals in the study of the metabolic functions of peptide hormone systems. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 17(1):11-7, 2008.

NI, A.; CHAI, K. X.; CHAO, L. E.; CHAO, J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. **Biochim Biophys Acta.** 1442(2-3):177-85, 1998.

NICKOLOFF, B. J.; BONISH, B. K.; MARBLE, D. J.; SCHRIEDEL, K. A.; DIPIETRO, L. A.; GORDON, K. B.; LINGEN, M. W. Lessons learned from psoriatic plaques concerning mechanisms of tissue repair, remodeling, and inflammation. **J Invest Dermatol Symp Proc.** 11(1):16-29, 2006.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol.** 507(1-3):253-9, 2005.

OWEN, N. E.; VILLERREAL, M. L. Lys-Bradykinin stimulates Na⁺ influx and DNA synthesis in cultured human fibroblasts. **Cell.** 32(3):979-85, 1983.

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(6):3038-45, 1998.

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(15):9918-22, 1999.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA JR., J. A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S. M.; PESQUERO, J. L.; PAIVA, A. C. M.; CALIXTO, J. B.; LEWIN, G. R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 97(14):8140-5, 2000.

PETERS, E. M.; ERICSON, M. E.; HOSOI, J.; SEIFFERT, K.; HORDINSKY, M. K.; ANSEL, J. C.; PAUS, R.; SCHOLZEN, T. E. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. **J Invest Dermatol.** 126(9):1937-47, 2006.

PLANELLAS-CASES, R.; GARCÍA-SANZ, N.; MORENILLA-PALAO, C.; FERRER-MONTIEL, A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. **Pflugers Arch.** 451(1):151-59, 2005.

POBLETE, M. T.; REYNOLDS, N. J.; FIGUEROA, C. D.; BURTON, J. L.; MÜLLER-ESTERL, W.; BHOOLA, K. D. Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. **Br J Dermatol.** 124(3):236-41, 1991.

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(2):435-8, 1993.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol.** 17(12):1063-72, 2008.

PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. **Inflammation.** 21(4):431-42, 1997.

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(2):689-94, 1997.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MANEZ, S.; CERDA, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RIOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sci.** 19;66(26):2509-18, 2000.

REGOLI, D. E.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev.** 32(1):1-46, 1980.

REGOLI, D.; NSA ALLOGHO, S.; RIZZI, A. E.; GOBEIL, F. J. Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol.** 348(1):1-10, 1998.

RITCHIE, R. H.; MARSH, J. D.; SCHIEBINGER, R. J. Bradykinin-stimulated protein synthesis by myocytes is dependent on the MAP kinase pathway and p70S6K. **Am J Physiol.** 276(4):1393-98, 1999.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol.** 156(2):261-73, 1949.

ROSENBACH, T.; LIESEGANG, C.; BINTING, S.; CZARNETZKI, B. M. Inositol phosphate formation and release of intracellular free calcium by bradykinin in HaCaT keratinocytes. **Arch Dermatol Res.** 285(7):393-6, 1993.

SABOURIN, T.; MORISSETTE, G.; BOUTHILLIER, J.; LEVESQUE, L.; MARCEAU, F. Expression of kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF-kappa B. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 283(1):H227-37, 2002.

SAMPAIO, A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica.** São Paulo: Artes Médicas, 2000.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 57(2-3):119-31, 1999.

SCHANSTRA, J. P.; BATAILLE, E.; MARIN CASTANO, M. E.; 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-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. **J Clin Invest.** 101(10):2080-91, 1998.

SCHOLZEN, T. E.; STEINHOFF, M.; BONACCORSI, P.; KLEIN, R.; AMADESI, S.; GEPPETTI, P.; LU, B.; GERARD, N. P.; OLERUD, J. E.; LUGER, T. A.; BUNNETT, N. W.; GRADY, E. F.; ARMSTRONG, C. A.; ANSEL, J. C. Neutral endopeptidase terminates substance P-induced inflammation in allergic contact dermatitis. **J Immunol.** 166(2):1285-91, 2001.

SCHOLZEN, T.E.; STANDER, S.; RIEMANN, H.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. **J Immunol.** 170(7):3866-73, 2003.

SCHREMMER-DANNINGER, E.; HEINZ-ERIAN, P.; TOPFER-PETERSEN, E.; ROSCHER, A. A. Autoradiographic localization and characterization of bradykinin receptors in human skin. **Eur J Pharmacol.** 283(1-3):207-16, 1995.

SCHREMMER-DANNINGER, E.; HERMANN, A.; FINK, E.; FRITZ, H.; ROSCHER, A. A. Identification and occurrence of mRNAs for components of the kallikrein-kinin system in human skin and in skin diseases. **Immunopharmacology.** 43(2-3):287-91, 1999.

SCHREMMER-DANNINGER, E.; NAIDOO, S.; NEUHOF, C.; VALESKE, K.; SNYMAN, C.; SANDER, C.; BHOOLA, K. D.; NEUHOF, H. Visualisation of tissue kallikrein, kininogen and kinin receptors in human skin following trauma and in dermal diseases. **Biol Chem.** 385(11):1069-76, 2004.

SEITZ, C. S.; LIN, Q.; DENG, H.; KHAVARI, P. A. Alterations in NF- κ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF- κ B. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95(5):2307-12, 1998.

SOARES, M. A. **Medicamentos não Prescritos.** Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa. 1995.

SOUTHALL, M. D.; LI, T.; GHARIBOVA, L. S.; PEI, Y.; NICOL, G. D.; TRAVERS, J. B. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. **J Pharmacol Exp Ther.** 304(1):217-22, 2003.

STÄNDER, S.; MOORMANN, C.; SCHUMACHER, M.; BUDDENKOTTE, J.; ARTUC, M.; SHPACOVITCH, V.; BRZOSKA, T.; LIPPERT, U.; HENZ, B. M.; LUGER, T. A.; METZE, D.; STEINHOFF, M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. **Exp Dermatol.** 13(3):129-39, 2004.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSCH, KM. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol.** 4(4):262-71, 1991.

TALWAR, H. S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Bradykinin induces phosphoinositide turnover, 1,2-diglyceride formation, and growth in cultured adult human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 95(6):705-10, 1990.

THIND, C. K.; ORMEROD, A. D. Recent advances in inflammatory skin diseases. **Scott Med J.** 53(2):30-4, 2008.

TU, C. L.; ODA, Y.; KOMUVES, L.; BIKLE, D. D. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. **Cell Calcium.** 35(3):265-73, 2004.

VIANNA, R.M.; ONGALI, B.; REGOLI, D.; CALIXTO, J.B.; COUTURE, R. Upregulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. **Br J Pharmacol.**138(1):13-22, 2003.

VIDAL, M. A.; ASTROZA, A.; MATUS, C. E.; EHRENFELD, P.; PAVICIC, F.; SANCHEZ, T.; SALEM, C.; FIGUEROA, J.; CONCHA, M.; GONZALEZ, C. B.; FIGUEROA, C. D. Kinin B2 Receptor-Coupled Signal Transduction in Human Cultured Keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 124(1):178-86, 2005.

WANG, M. M.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAK, C. R. In vivo stimulation of 12(S)-lipoxygenase in the rat skin by bradykinin and platelet activating factor: formation of 12(S)-HETE and hepoxilins, and actions on vascular permeability. **Biochim Biophys Acta.** 1436(3):354-62, 1999.

WEISS, C.; ATLAS, D. The bradykinin receptor--a putative receptor-operated channel in PC12 cells: studies of neurotransmitter release and inositol phosphate accumulation. **Brain Res.** 8;543(1):102-10, 1991.

WILLIAMS, H. C. Clinical practice. Atopic dermatitis. **N Engl J Med.** 2;352(22):2314-24, 2005.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci.** 58(18):1485-507, 1996.

YAMAMOTO, T.; TSURUTA, J.; KAMBARA, T. Interstitial-tissue localization of high-molecular-weight kininogen in guinea-pig skin. **Biochem Biophys Acta.** 916(3):332-42, 1987.

YANG, X. E.; POLGAR, P. Genomic structure of the human bradykinin B1 receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. **Biochem Biophys Res Commun.** 222(3):718-25, 1996.

YOKOYAMA, S.; KIMURA, Y.; TAKETO, 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(1):634-41, 1994.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.M.; SPIRES D.A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **J Invest Dermatol.** 80(1):48-52, 1983.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J Invest Dermatol.** 82(4):367-71, 1984.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacol Rep.** 58(1):13-21, 2006.

ZHOU, X.; PRADO, G. N.; TAYLOR, L.; YANG, X.; POLGAR, P. Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. **J Cell Biochem.** 78(3):351-62, 2000.

8 ANEXO

8.1. Publicações

8.1.1. Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese:

1. PIETROVSKI, E. F.; OTUKI, M. F.; REGOLI, D.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; CABRINI, D. A.; ZAMPRONIO, A. R. The non-peptide kinin receptor antagonists FR 173657 and SSR 240612: Preclinical evidence for the treatment of skin inflammation. **Regul Pept.** 8;152(1-3):67-72, 2009.

2. PIETROVSKI, E. F.; OTUKI, M. F.; PALUDO, K. S.; GUIMARÃES, F. S. F.; VEIGA, S. S.; BUCHI, D. F.; REGOLI, D.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A. B₁ and B₂ kinin receptors participation in hyperproliferative and inflammatory skin process in mice. **J Invest Dermatol.** Em processo de redação.

8.1.2. Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese:

1. ALBERTON-MAGINA, M.; PIETROVSKI, E. F.; GOMIG, F.; FALKENBERG, D. B.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). **RBCF.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2009. Aceito para publicação.

2. GOMIG, F.; PIETROVSKI, E. F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E. M.; CALDERARI, M. T.; GUIMARÃES, C. L.; PINHEIRO, R. M.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **J Ethnopharmacol.** 23;118(2):220-4, 2008.

3. PIETROVSKI, E. F.; MAGINA, M. D.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C. F.; MICKE, G. A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M. G.; CABRINI, D. A.; BRIGHENTE, I. M.; OTUKI, M. F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **J Pharm Pharmacol.** 60(4):479-87, 2008.

4. OTUKI, M. F.; PIETROVSKI, E. F.; CABRINI, D. A. Topical simvastatin: preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **J Dermatol Sci.** 44(1):45-7, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)