

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RAQUEL FERREIRA DE CARVALHO

**ESTUDO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA AMPLIFICAÇÃO DO
EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA OU DEXTRAN EM
RATOS**

**FORTALEZA
2005**

RAQUEL FERREIRA DE CARVALHO

**ESTUDO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA AMPLIFICAÇÃO DO EDEMA DE
PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA OU DEXTRAN EM RATOS**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito

**FORTALEZA
2005**

RAQUEL FERREIRA DE CARVALHO

**ESTUDO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA AMPLIFICAÇÃO DO EDEMA DE
PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA OU DEXTRAN EM RATOS**

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada com Louvor em 21/03/2005

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito (orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Trabalho realizado no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)

A meus pais, irmãos e ao meu
companheiro Daniel, pela eterna
compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Gerly Anne de Castro Brito, pelo incentivo, competência, paciência, pela imensa presteza em orientar todos os passos desse trabalho e, sobretudo, pela compreensão nos momentos delicados.

Ao Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela acolhida no laboratório e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Professor Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, por ter colaborado com este trabalho e por sua dedicação ao LAFICA.

Ao Professor Fernando Queiroz Cunha e à Giuliana Bertozi, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pela gentileza na execução das dosagens de citocinas.

Aos Professores Armênio Aguiar dos Santos e Flávia Almeida Santos pelas sugestões valiosas durante o meu exame de qualificação.

Aos bolsistas de iniciação científica Rodrigo Costa Lima e Ryan Falcão, que tiveram participação valiosa e indispensável na execução dos experimentos.

À Maria Silvandira França Pinheiro, a Wandinha, pela imensa disponibilidade em ajudar e pelos ensinamentos no LAFICA.

Ao José Ivan Rodrigues, pela confecção das lâminas histológicas, sempre com dedicação e boa vontade.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Sílvia, Aura e Rose e especialmente para os funcionários do biotério, Dra. Artemísia, Phoebe e Júnior pela disposição constante em ajudar.

Aos amigos do LAFICA: Renata, Ingrid, Sílvia, Virgínia, Mariana, Vilma, Rose, Antoniella, Hellíada, Rondinele, pelo companheirismo e convivência prazerosa.

Ao amigo Carlos Thiago, pelo constante prazer em ajudar.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço finalmente a Deus, que está sempre comigo nos momentos de vitórias e também naqueles mais difíceis.

RESUMO

A Angiotensina II (Ang II) exerce suas ações via receptores AT1 e AT2. Estudos recentes demonstraram que o sistema-renina-angiotensina (SRA) participa da inflamação. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da Ang II em modelos de inflamação aguda. Ratos *Wistar* foram separados nos grupos: salina (Sal), Ang II (1 μ g), losartan (LOS, antagonista de AT1, 62,5 μ g) e CGP42112A (agonista de AT2, 142,5 μ g). O edema de pata foi induzido pela injeção subplantar (sp) de carragenina (Cg, 100 μ g) ou dextran (DXT, 100 μ g) e foi medido com pletismômetro em 0, 1, 2, 3 e 4h. Nos grupos Sal e Ang II, foi colhido tecido da pata para se determinar os níveis de mieloperoxidase (MPO), IL-1 e TNF- α . Tecidos subcutâneo e mesentérico foram removidos para avaliação da degranulação de mastócitos através da coloração com azul de toluidina. Os grupos Sal e Ang II do edema de pata induzido por DXT foram tratados com mepiramina (MEP, anti-histamínico, 10mg/kg) ou metisergida (MET, anti-serotonínico, 1,5mg/kg) 1h antes da injeção de DXT. Ang II (0,5 μ g/cavidade, ip) foi injetada 1h antes da injeção ip de Cg para analisar a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Ang II, LOS e CGP amplificaram o edema de pata induzido por Cg e DXT e essa amplificação foi significativa já na primeira hora. A administração de Ang II não alterou a dosagem tecidual de MPO, TNF- α e IL-1 e não induziu ou preveniu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, mas induziu amplificação significativa da degranulação de mastócitos. MEP e MET reduziram a potenciação do edema do DXT pela Ang II. Nossos resultados sugerem que a Ang II potencializou a resposta inflamatória provavelmente através de receptores AT2, já que o antagonista de AT1, o agonista de AT2 e a Ang II amplificaram o edema de pata. Os dados apresentados aqui sugerem que Ang II aumentou a permeabilidade vascular através da indução da degranulação de mastócitos, uma vez que houve amplificação precoce do edema de pata da Cg e do edema vascular do DXT, e os antagonistas de serotonina e de histamina inibiram significativamente o aumento do edema de pata.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) exerts its actions via AT1 and AT2 receptors. Recent studies have demonstrated that the renin-angiotensin system (RAS) participates in inflammation. The aim of this study was to evaluate the effect of Ang II on models of acute inflammation. *Wistar* rats were separated in the groups: saline (Sal), Ang II (1 μ g), losartan (LOS, AT1 antagonist, 62.5 μ g) and CGP42112A (AT2 agonist, 142.5 μ g). Paw edema was induced by subplantar injection of carrageenan (Cg, 100 μ g) or dextran (DXT, 100 μ g) and was measured with a plethysmometer at 0, 1, 2, 3 and 4h. In the Sal and Ang II groups, paw tissue was taken to determine myeloperoxidase (MPO), IL-1 and TNF- α levels. Subcutaneous and mesenterium tissue were taken to evaluate mast cell degranulation through the toluidine blue staining. Sal and Ang II groups of DXT-induced paw edema were treated i.p. with mepyramine (MEP, anti-histamine, 10mg/kg) or metisergide (MET, anti-serotonin, 1.5mg/kg) 1h prior to the injection of DXT. Ang II (0.5 μ g/cavity, ip) was injected i.p. 1h before the i.p. injection of Cg to analyse the leukocytes migration to the peritoneal cavity. Ang II, LOS and CGP enhanced the Cg and DXT-induced paw edema and this enhancement was already significant at 1h. The administration of Ang II did not change the tissue content of MPO, TNF- α and IL-1 and did not induced or prevented neutrophil migration to peritoneal cavity, but induced significant enhancement of mast cell degranulation. MEP and MET reduced the Ang II-facilitated DXT-induced edema. Our results suggest that Ang II enhances the inflammatory response probably through the AT2 receptors since the AT1 antagonist, AT2 agonist and Ang II potentiated the paw edema. The data presented here also suggest that Ang II increases the vascular permeability through induction of mast cells degranulation, since there was early amplification of Cg paw edema and DXT vascular edema, and antagonists of serotonin and histamine significantly inhibited the increase in paw edema.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP:	adenosina difosfato
AIDS:	síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP _c :	adenosina monofosfato cíclico
Ang II:	angiotensina II
AP-1:	fator ativador de proteína 1
ASC:	área sob a curva
AT1:	receptor tipo 1 da angiotensina II
AT2:	receptor tipo 1 da angiotensina II
BK:	bradicinina
C5a:	fração 5a do complemento
C3a:	fração 3a do complemento
Cg:	carragenina
COX:	ciclooxigenase
COX-1:	ciclooxigenase 1
COX-2:	ciclooxigenase 2
DAG:	diacilglicerol
DXT:	dextran
ECA:	enzima conversora de angiotensina
fMLP:	formil-metionil-leucil-fenilalanina
g:	grama
GMP _c :	guanosina monofosfato cíclico
h:	hora (s)
H&E:	hematoxilina e eosina
5-HT:	serotonina
ICAM-1:	molécula de adesão intercelular 1
IFN γ :	interferon γ
IgE:	imunoglobulina E
IL-1:	interleucina 1
IL-3:	interleucina 3
IL-4:	interleucina 4
IL-5:	interleucina 5

IL-6:	interleucina 6
IL-8:	interleucina 8
IL-13:	interleucina 13
ip.:	intraperitoneal
IP ₃ :	trifosfato de inositol
kg:	kilograma
LOS:	losartan
LPS:	lipopolissacarídeo
LT:	leucotrieno
LTB ₄ :	leucotrieno B ₄
LTC ₄ :	leucotrieno C ₄
LTD ₄ :	leucotrieno D ₄
LTE ₄ :	leucotrieno E ₄
MCP-1:	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MEP:	mepiramina
MET:	metisergida
mg:	miligrama
min:	minuto (s)
mL:	mililitros
mM:	milimolar
MPO:	mieloperoxidase
NF-κB:	fator de transcrição nuclear κB
ng:	nanograma
NO:	óxido nítrico
PA:	pressão arterial
PAF:	fator de agregação plaquetária
PAI-1:	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
PAMP:	padrões moleculares associados a patógenos
pg:	picograma
PGD ₂ :	prostaglandina D ₂
PGE ₁ :	prostaglandina E ₁
PGI ₂ :	prostaciclina
PIP ₂ :	bifosfato de fosfatidilinositol
PKC:	proteína quinase C

PLA ₂ :	fosfolipase A ₂
PLC:	fosfolipase C
PLD:	fosfolipase D
PLD ₂ :	fosfolipase D ₂
PMN:	polimorfonucleares
RANTES:	<i>regulated upon activation: normal T cell expressed (secreted)</i>
RNA _m :	RNA mensageiro
Sal:	salina
sp.:	subplantar
SRA:	sistema-renina-angiotensina
μg:	micrograma
TNF-α:	fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1:	molécula de adesão da célula endotelial 1
VEGF:	fator de crescimento do endotélio vascular
VPF:	fator de permeabilidade vascular
x:	vezes

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Efeito da Angiotensina II sobre o volume do edema de pata induzido por Carragenina em ratos.....	63
FIGURA 2 – Efeito da Angiotensina II sobre o infiltrado celular inflamatório e o edema intersticial em ratos tratados com Carragenina sp.....	64
FIGURA 3 – Efeito do antagonista de AT1 (Losartan) sobre o volume do edema de pata induzido por Carragenina em ratos.....	65
FIGURA 4 – Efeito do agonista de AT2 (CGP-42112A) sobre o volume do edema de pata induzido por Carragenina em ratos.....	67
FIGURA 5 – Efeito da Angiotensina II sobre o volume do edema de pata induzido por Dextran em ratos.....	69
FIGURA 6 – Efeito do antagonista de AT1 (Losartan) sobre o volume do edema de pata induzido por Dextran em ratos.....	70
FIGURA 7 – Efeito do anti-histamínico Mepiramina sobre a modulação por angiotensina II do edema de pata induzido por Dextran em ratos.....	72
FIGURA 8 – Efeito do anti-serotoninérgico Metisergida sobre a modulação por angiotensina II do edema de pata induzido por Dextran em ratos.....	73
FIGURA 9 – Efeito da Angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos induzida por Carragenina ou por Dextran na pata de ratos.....	75
FIGURA 10 – Efeito da Angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos na pata de ratos tratados com Carragenina sp – histológico.....	76
FIGURA 11 – Efeito da Angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos em mesentério de ratos induzida pelo composto 48/80.....	78
FIGURA 12 – Efeito da Angiotensina II (ip) sobre a degranulação de mastócitos em mesentério de ratos incubados com o composto 48/80 – histológico.....	79
FIGURA 13 – Efeito da Angiotensina II sobre a dosagem de TNF- α na pata de ratos tratados com Carragenina ou Salina sp.....	81
FIGURA 14 – Efeito da Angiotensina II sobre a dosagem de IL-1 β na pata de ratos tratados com Carragenina ou Salina sp.....	82
FIGURA 15 – Efeito da Angiotensina II sobre a dosagem de mieloperoxidase na pata de ratos tratados com Carragenina ou Salina sp.....	84
FIGURA 16 – Efeito da Angiotensina II sobre a migração de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal induzida por Carragenina em ratos.....	85

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	2
1. ANGIOTENSINA II: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
2. RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II	4
3. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	11
4. PERMEABILIDADE VASCULAR E EDEMA	14
5. A BIOLOGIA DOS MASTÓCITOS	21
6. EVENTOS CELULARES DA INFLAMAÇÃO	26
7. ANGIOTENSINA II E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	30
II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	40
III. MATERIAL E MÉTODOS	43
1. ANIMAIS	43
2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.....	43
3. DROGAS, SOLUÇÕES, CORANTES E ANTISOROS	45
3.1. DROGAS.....	45
3.2. CORANTES	46
3.3. SOLUÇÕES.....	46
3.4. TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS PARA O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	47
3.5. ANTICORPOS	48
3.6. TAMPÕES E SOLUÇÕES USADOS NA DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPROXIDASE.....	48
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	49
4.1. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS WISTAR	49
4.2. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS WISTAR	50
4.3. INFLUÊNCIA DA MEPIRAMINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS WISTAR	51
4.4. INFLUÊNCIA DA METISERGIDA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS WISTAR	52
4.5. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA POR CARRAGENINA OU DEXTRAN NA PATA DE RATOS WISTAR.....	53
4.6. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 EM MESENTÉRIO DE RATOS WISTAR.....	54
4.7. DOSAGEM DE TNF- α E IL-1 β NA PATA DE RATOS WISTAR POR ELISA	55
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NA PATA DE RATOS WISTAR	57
4.9. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS WISTAR.....	59
IV. RESULTADOS.....	62
1. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (CG) EM RATOS WISTAR	62
2. EFEITO DO ANTAGONISTA DE AT1 (LOSARTAN-LOS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (CG) EM RATOS WISTAR	62

3. EFEITO DO AGONISTA DE AT2 (CGP 42112A) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (CG) EM RATOS <i>WISTAR</i>	66
4. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS <i>WISTAR</i>	68
5. EFEITO DO ANTAGONISTA DE AT1 (LOSARTAN-LOS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS <i>WISTAR</i>	68
6. EFEITO DO ANTI-HISTAMÍNICO MEPIRAMINA (MEP) SOBRE A MODULAÇÃO POR ANGIOTENSINA II (ANG II) DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS <i>WISTAR</i>	71
7. EFEITO DO ANTI-SEROTONÍNÉRGINICO METISERGIDA (MET) SOBRE A MODULAÇÃO POR ANGIOTENSINA II (ANG II) DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS <i>WISTAR</i>	71
8. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NA PATA DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM CARRAGENINA (CG).....	74
9. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NA PATA DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM DEXTRAN (DXT)	74
10. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 EM MESENTÉRIO DE RATOS <i>WISTAR</i>	77
11. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE O AUMENTO DA DOSAGEM DE TNF- α NA PATA DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM CARRAGENINA (CG).....	80
12. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE O AUMENTO DA DOSAGEM DE IL1- β NA PATA DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM CARRAGENINA (CG).....	80
13. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NA PATA DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM CARRAGENINA (CG).....	83
14. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A MIGRAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES (PMN) PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS <i>WISTAR</i> TRATADOS COM CARRAGENINA (CG)	83
V. DISCUSSÃO	87
VI. CONCLUSÕES	105
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. ANGIOTENSINA II: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Angiotensina II (Ang II) é um polipeptídeo derivado do plasma que tem ações importantes em várias partes do corpo, como músculo liso vascular, córtex supra-renal, rim, cérebro, dentre outros.

O sistema-renina-angiotensina (SRA) atua de modo sinérgico com o sistema nervoso simpático estimulando a produção de aldosterona, que exerce atividade essencial no controle da excreção de sódio e do volume de líquido, bem como no tônus vascular. A renina é uma enzima proteolítica secretada na circulação por células do aparelho justaglomerular. A renina é secretada em resposta a diversos estímulos fisiológicos, como redução na concentração de sódio no líquido do túbulo distal e também por uma queda na pressão de perfusão renal. A atividade nervosa simpática renal, os agonistas dos receptores β -adrenérgicos e a prostaciclina (PGI_2) estimulam diretamente a secreção de renina, enquanto a Ang II produz inibição por retroalimentação (*feedback* negativo). O peptídeo natriurético atrial também inibe a secreção de renina. A renina é rapidamente depurada do plasma. Ela atua sobre o angiotensinogênio, uma globulina plasmática produzida no fígado, separando um decapeptídeo, a angiotensina I, da extremidade N-terminal da proteína. A angiotensina I não tem atividade intrínseca apreciável, porém, é convertida por enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo, a Ang II, responsável por ações variadas em diversas partes do corpo. Ela age diretamente sobre a zona glomerulosa do córtex supra-renal, estimulando a

biossíntese e a secreção de aldosterona. A Ang II pode ser degradada por enzimas, as aminopeptidase A e N, que removem aminoácidos isolados de modo seqüencial a partir da extremidade N-terminal, produzindo angiotensina III e angiotensina IV respectivamente. Atualmente, sabe-se que a angiotensina III estimula a secreção de aldosterona e está envolvida no mecanismo da sede. A angiotensina IV também apresenta ações distintas, incluindo liberação do inibidor do ativador de plasminogênio I (PAI-I, *plasminogen activator inhibitor 1*) do endotélio. A ECA é uma enzima ligada à membrana superficial das células, principalmente das células endoteliais. Ela está presente em vários tecidos, como pulmão, coração, rim, cérebro e no músculo estriado. Conseqüentemente, pode ocorrer formação local de Ang II em diferentes tecidos, proporcionando ação local, independente da Ang II transportada pela corrente sanguínea (RANG *et al.*, 2003). A ECA é uma enzima do tipo cininase II, que inativa a bradicinina e vários outros peptídeos vasodilatadores. Isso pode contribuir para as ações farmacológicas das drogas inibidoras da ECA, como veremos adiante (RANG *et al.*, 2003; BOURA & SVOLMANIS, 1984).

Segundo LUFT (2001), a Ang II é considerada um hormônio regulatório, estimulando a constrição das células do músculo liso vascular, secreção de aldosterona da glândula adrenal e a reabsorção de sódio nos túbulos renais. Através dessas ações, o SRA exerce um papel importante na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial (PA) (MIFUNE *et al.*, 2000; LUFT, 2001; JOHANSSON *et al.*, 2001).

A Ang II é uma substância pressora muito potente e esta resposta pressora se deve, em grande parte, à contração direta do músculo liso vascular, especialmente o arteriolar. No entanto, a Ang II também pode

aumentar a PA por ação sobre o cérebro e o sistema nervoso autônomo. Ela age sobre o cérebro reajustando o controle reflexo barorreceptor da frequência cardíaca para uma pressão mais alta; assim, a resposta pressora a Ang II geralmente é acompanhada de pouca ou nenhuma bradicardia. A Ang II também interage com o sistema nervoso autônomo periférico estimulando os gânglios autonômicos, aumentando a liberação de adrenalina e noradrenalina pela medula supra-renal e facilitando a transmissão simpática pela ação nos terminais nervosos adrenérgicos (REID, 1992).

A Ang II é mitogênica para células musculares cardíacas e vasculares e pode contribuir para a hipertrofia cardiovascular (SCHELLING, 1991; CAO *et al.*, 1999). Segundo KONSTAM e cols (1992) já existem evidências de que os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) vão retardar, ou mesmo evitar, o desenvolvimento de alterações morfológicas subseqüentes a infartos do miocárdio evitando, assim, o aparecimento posterior de insuficiência cardíaca congestiva.

Portanto, a Ang II regula a PA, o volume plasmático, a atividade de nervos simpáticos; ela também desempenha um papel importante na patogênese das doenças cardiovasculares, como hipertrofia, infarto do miocárdio, hipertensão e aterosclerose. A Ang II era inicialmente conhecida apenas como um peptídeo vasoconstrictor. No entanto, vários estudos já comprovaram que ela apresenta características de fator de crescimento e de citocina, desempenhando um papel ativo no processo inflamatório (HORIUCHI *et al.*, 1999; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2000; TOUYZ & BERRY, 2002).

2. RECEPTORES DA ANGIOTENSINA II

A Ang II exerce ações em diversos tecidos controlando o tônus vascular, a secreção de hormônios, o crescimento tecidual e as atividades neuronais. Todas essas ações ocorrem devido à modulação de receptores específicos, designados como receptor do tipo 1(AT1) e receptor do tipo 2 (AT2). Eles foram seqüenciados e clonados com base na afinidade diferencial por ligantes peptídicos (CGP 42112A) e não-peptídicos (Losartan -LOS, PD 123319) (BUMPUS *et al.*, 1991).

A maior parte das ações conhecidas da Ang II nos tecidos adultos é mediada pelos receptores AT1. Os receptores AT2 são abundantemente expressos em tecidos fetais, mas presentes apenas em extensão limitada nos tecidos adultos, como medula adrenal, regiões específicas do cérebro, miométrio uterino e coração (GRIENGLING *et al.*, 1996; BELONI *et al.*, 1998). No entanto, uma *up regulation* de receptores AT2 já foi relatada em algumas condições, como no infarto do miocárdio, na hipertrofia cardíaca e nos processos de cicatrização da pele, sugerindo um envolvimento de tal receptor com processos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (VISWANATHAN & SAAVEDRA, 1992; VISWANATHAN *et al.*, 1996; ICHIKI *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 1997).

Os receptores AT1 têm grande afinidade por LOS e pouca afinidade por PD 123319 e CGP 42112A, enquanto os receptores AT2 têm grande afinidade por PD 123319 e CGP 42112A e pouca afinidade por LOS. A Ang II liga-se igualmente a ambos os subtipos. No entanto, a proporção relativa dos dois subtipos varia de um tecido para o outro (MARTINEAU *et al.*, 1999; JOHANSSON *et al.*, 2001; TOUYZ & BERRY, 2002).

Segundo TOUYZ & BERRY (2002) a Ang II é um hormônio multifuncional que influencia a função de células cardiovasculares através de uma complexa série de eventos sinalizadores intracelulares iniciados pela ligação da Ang II aos receptores AT1 e AT2. De acordo com os autores, a ativação dos receptores AT1 normalmente promove crescimento celular, vasoconstrição, respostas inflamatórias e retenção de sal e água, enquanto os receptores AT2 induzem apoptose, vasodilatação e natriurese. Os efeitos mencionados são mediados por complexas vias sinalizadoras envolvendo estimulação da fosfolipase C (PLC) e mobilização de cálcio; ativação de fosfolipase D (PLD), fosfolipase A₂ (PLA₂), proteína quinase C (PKC), MAP quinases e NADPH oxidase e estimulação da transcrição genética. Além disso, a Ang II pode ativar várias tirosinas quinases intracelulares, desempenhando um papel importante no crescimento e na inflamação (MATSUSAKA & ICHIKAWA, 1997).

Os receptores AT1 são o subtipo predominante no controle das funções vasculares mediadas por Ang II (MATSUSAKA & ICHIKAWA, 1997). Na vasculatura, receptores AT1 são expressos principalmente nas células musculares lisas (MATSUSAKA & ICHIKAWA, 1997). No coração, os receptores AT1 estão presentes nos cardiomiócitos e fibroblastos (ALLEN, ZHUO & MENDELSON, 2000). O efeito vasoconstrictor da Ang II ocorre através da ativação dos receptores AT1, o que contribui para o aumento da PA. Esse efeito da Ang II via receptores AT1 já vem sendo utilizado no tratamento farmacológico da hipertensão arterial, onde são utilizadas drogas bloqueadoras seletivas desses receptores. Os antagonistas normalmente utilizados são o LOS e o Valsartan (CAREY *et al.*, 2001). CHENG e cols (1999) demonstraram

que Ang II é um potente ativador da expressão gênica de *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) em cultura de células musculares lisas. Os autores também demonstraram que a indução de MCP-1 pela Ang II ocorreu através de um mecanismo mediado por receptores AT1. Tais ações pró-inflamatórias da Ang II via receptores AT1 podem contribuir para a aterogênese, uma vez que promovem a migração de monócitos para a parede dos vasos. Além disso, Ang II induziu aumento da expressão do fator de permeabilidade vascular em células musculares lisas da vasculatura humana e isso foi inibido pelo Losartan, antagonista de receptores AT1 (WILLIAMS *et al.*, 1995). Isso sugere que os receptores AT1 medeiam o aumento de permeabilidade vascular promovido pela Ang II.

O bloqueio de receptores AT1 em ratos reduziu a hipertrofia cardíaca e a fibrose após infarto do miocárdio, sugerindo um papel de tais receptores em promover o crescimento celular e o desenvolvimento de fibrose (SCHIEFFER *et al.*, 1994). Segundo WU e cols (2001), o bloqueio de receptores AT1 associado à estimulação de receptores AT2 atenuou a formação da neoíntima e inibiu a inflamação em artérias de camundongos que sofreram injúria, sugerindo que receptores AT1 estão envolvidos nos processos de crescimento celular e de inflamação.

FUNAKOSHI e cols (1999) investigaram o efeito da Ang II sobre a produção de interleucina 6 (IL-6) em cultura de células musculares lisas da vasculatura de ratos *in vitro*. Ang II potenciou de forma significativa e dose-dependente a expressão de IL-6, que, segundo os autores, é uma citocina pró-inflamatória. Esse efeito foi completamente bloqueado pelo antagonista dos

receptores AT1, o CV11974, sugerindo um papel de receptores AT1 em induzir a síntese de citocinas, apresentando efeito pró-inflamatório.

A ligação da Ang II ao receptor AT1 leva à ativação de proteínas G através da troca de guanosina trifosfato (GTP) por guanosina difosfato (GDP), resultando em liberação da subunidade α e do complexo $\beta\gamma$, que medeiam as ações subseqüentes. Os receptores AT1 interagem com vários tipos de proteína G, como Gq/11, Gi, G α 12 e G α 13. As diferentes isoformas de proteína G estão ligadas a diferentes cascatas de sinalização. A ativação de Gq, por exemplo, resulta em ativação da PLC, ao passo que G α leva à formação de guanosina monofosfato cíclico (GMP_c) (TOUYZ & BERRY, 2002).

A segunda maior isoforma de receptores da Ang II, são os receptores AT2, cuja expressão pode ser modulada por estados patológicos associados com remodelamento tecidual e inflamação (MATSUBARA, 1998; AKISHITA *et al.*, 2000). Tais receptores são re-expressos em adultos após injúria vascular e cardíaca (infarto do miocárdio) e também durante os processos de cicatrização e obstrução renal, sugerindo que o receptor AT2 está intimamente envolvido com o crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (VISWANATHAN & SAAVEDRA, 1992; VISWANATHAN *et al.*, 1996; ICHIKI *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 1997). O papel funcional destes receptores ainda não foi bem esclarecido, mas sabe-se que eles podem antagonizar, sob condições fisiológicas, os efeitos mediados pelos receptores AT1 e assim inibir o crescimento celular, promover apoptose e vasodilatação (HORIUCHI *et al.*, 1997; MATSUBARA, 1998; TOUYZ *et al.*, 1999; TOUYZ & BERRY, 2002). Na insuficiência cardíaca e na formação da neoíntima após injúria, receptores AT2 são re-expressos nas células que estão proliferando, exercendo um efeito

inibitório sobre os sinais mitogênicos produzidos pela Ang II, bem como sobre a síntese de matriz extracelular, resultando em atenuação da remodelação tecidual. Uma forma extrema de inibição do crescimento celular culmina com a indução da morte celular programada (apoptose), que foi induzida via receptores AT2 (MATSUBARA, 1998).

Em miócitos cardíacos e nas células da musculatura lisa vascular de camundongos que apresentavam sobre-expressão de receptores AT2, houve inibição da atividade pressora da Ang II. Além disso, a ativação desses receptores nos sistemas cardiovascular e renal, resultou em cardioproteção, vasodilatação e natriurese, efeitos contrários àqueles normalmente observados para receptores AT1 (NAKAJIMA *et al.*, 1995; MATSUBARA, 1998). Além disso, dados da literatura demonstram que os receptores AT2 participam da secreção de catecolaminas pela glândula adrenal (MARTINEAU *et al.*, 1999), da síntese de colágeno em células musculares lisas da vasculatura *in vitro* (KATO *et al.*, 1999; MIFUNE *et al.*, 2000), da secreção mucosa alcalina no duodeno (JOHANSSON *et al.*, 2001) e também de processos pró-inflamatórios (RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000; SUZUKI *et al.*, 2000; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001).

Os receptores AT2 podem também exercer um papel importante no controle da PA. Dados científicos indicam que esses receptores induzem uma vasodilatação sistêmica, contrabalançando o efeito vasoconstrictor da Ang II sobre os receptores AT1. Essas pesquisas a respeito dos receptores AT2 tornaram-se possíveis com a descoberta de agonistas e antagonistas seletivos para este receptor, como o CGP 42112 A e o PD 123319, respectivamente (BARBER *et al.*, 1999; CAREY *et al.*, 2001).

As principais cascatas envolvidas com a sinalização de receptores AT₂ são: ativação de proteínas fosfatase e proteínas que promovem desfosforilação; regulação do sistema GMP_c - óxido nítrico (NO) e estimulação da PLA₂ (MATSUBARA, 1998; HORIUCHI *et al.*, 1999).

SEYEDI e cols (1995) estudaram os vasos sangüíneos de corações de cães e pesquisaram se Ang I, II e seus fragmentos metabólicos (Ang III, IV e Ang-1-7) seriam capazes de promover a liberação de NO e quais seriam os mecanismos envolvidos neste processo. Ang I, II e todos os seus fragmentos metabólicos promoveram significativo aumento da liberação de nitrito. Tal efeito foi bloqueado por Hoe 140, um antagonista dos receptores B₂ de bradicinina (BK), indicando que a liberação de nitrito está relacionada com a formação local de cininas. O antagonista de receptores AT₁, LOS e o antagonista de receptores AT₂, PD 123319 eliminaram a liberação de nitrito em resposta aos diversos tipos de Ang. Os autores concluíram que a formação de nitrito na microvasculatura coronária bem como nas grandes artérias de cães em resposta aos diversos tipos de Ang ocorre devido à ativação da produção local de cininas. Segundo o estudo de Boulanger e cols (1995), o estímulo de receptores AT₁ de carótidas de ratos causou a liberação de NO que, por sua vez, inibiu a vasoconstrição proporcionada pela Ang II, fenômeno também mediado pelos receptores AT₁.

Segundo RUIZ-ORTEGA e cols (2000) a Ang II ativa o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) através de AT₁ e de AT₂ nas células da musculatura lisa vascular. NF- κ B é um fator de transcrição ambíguo de importância particular para a resposta inflamatória. Vários estímulos relevantes nas doenças cardiovasculares podem ativar este fator, a saber: citocinas pró-

inflamatórias, NO, espécies reativas de oxigênio e também as forças mecânicas. Uma vez ativado, NF- κ B leva ao aumento da expressão de vários genes cujos produtos (citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão) medeiam a resposta inflamatória.

Os receptores AT1 e AT2 estão ligados à membrana plasmática das células-alvo, o que possibilita o início rápido das ações fisiológicas da Ang II. Além disso, grande parte das ações da Ang II que são mediadas pelos receptores AT1 e AT2 são ações opostas, exibindo, assim, um antagonismo fisiológico na maioria dos casos (MATSUBARA, 1998; HORIUCHI *et al.*, 1999; DE GASPARO *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001).

3. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Embora os primeiros relatos sobre a inflamação tenham sido encontrados em escritos egípcios de 3000 anos a.C., foi Cornelius Celsus, um escritor romano, que, no início da era cristã, descreveu os quatro sinais cardinais da reação inflamatória: rubor, calor, tumor e dor. O quinto sinal, perda de função, foi mais tarde acrescentado por Virchow no século XIX (*apud* ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Em 1973, John Hunter observou que a inflamação não deve ser classificada como uma doença, mas sim como um conjunto de reações não específicas. No século XIX, Julius Cohnheim foi o primeiro a utilizar o microscópio para observar os vasos sanguíneos em tecidos inflamados. Dando continuidade às inúmeras descobertas que ajudaram a explicar o processo inflamatório, um biólogo russo, Elie Metchnikoff descobriu o processo da

fagocitose em 1882; segundo Metchnikoff, o propósito da inflamação seria levar células fagocíticas ao sítio da injúria para destruir o microorganismo invasor. Isso, no entanto, não corroborava com a teoria humoral de Paul Ehrlich vigente àquela época de que o objetivo da reação inflamatória seria levar os fatores derivados do plasma ao sítio da injúria para neutralizar os agentes infecciosos. A partir de então, reconheceu-se que tanto o fator celular (fagócitos) quanto o fator derivado do plasma (anticorpos) são importantes para a defesa contra os microorganismos. Outro nome importante ligado à história do estudo do processo inflamatório foi Thomas Lewis, que estabeleceu o conceito de que algumas substâncias químicas formadas em resposta a injúria, como a histamina, medeiam alterações vasculares importantes no processo da inflamação. Esse conceito de Lewis foi muito importante, uma vez que abordou a existência dos mediadores químicos da inflamação e, conseqüentemente, possibilitou o uso de agentes antiinflamatórios (*apud* COLLINS, 1999).

O evento desencadeante da reação inflamatória é o reconhecimento, por receptores de superfície de macrófagos ou células dendríticas, de padrões moleculares associados a patógenos (PMAP) (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Essas estruturas são componentes que grandes classes de patógenos têm em comum, como o lipopolissacarídeos (LPS) das paredes bacterianas (RANG *et al.*, 2003). A interação entre PMAP e receptor produz uma resposta imediata que envolve endocitose do agente estranho, gerando sua destruição e o processamento de seus componentes, posteriormente apresentados como antígenos; ativação de NF- κ B, que estimula a transcrição dos genes relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais se

destacam a IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PARKIN & COHEN, 2001).

Vários agentes exógenos e endógenos podem causar injúria celular. Estes mesmos estímulos são capazes de evocar uma série complexa de reações, em especial nos tecidos vascularizados, chamadas de reações inflamatórias. Microscopicamente, este processo envolve alguns eventos: a) dilatação de artérias, capilares e vênulas com aumento da permeabilidade e do fluxo sanguíneo; b) exudação de fluidos, incluindo proteínas plasmáticas e c) migração de leucócitos para o foco da inflamação. (ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985; COLLINS, 1999)

A inflamação pode ser didaticamente dividida em duas fases: aguda e crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar minutos, horas ou mesmo alguns dias; sua principal característica é a presença de exudato rico em proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. A inflamação crônica, porém, é de longa duração e está relacionada com algumas alterações histológicas, como presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose do tecido (COLLINS, 1999; RANG *et al.*, 2003).

A resposta inflamatória normalmente ocorre simultaneamente ao processo de reparo. Além de destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor, a inflamação é responsável por eventos que, sempre que possível, promovem a cura e a cicatrização do tecido afetado. O processo de reparo inicia-se já nas primeiras fases da inflamação, mas atinge seu clímax após a neutralização do agente agressor (COLLINS, 1999; RANG *et al.*, 2003).

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora que tem como meta livrar o organismo tanto da causa inicial da injúria (micróbios, toxinas) como também das conseqüências de tal injúria (células e tecidos necróticos). No entanto, existem algumas condições em que a falta de resposta inflamatória, ou mesmo a sua exarcebação, pode tornar-se incompatível à saúde do organismo. Quando as defesas estão diminuídas, como ocorre na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ou mesmo quando as defesas encontram-se suprimidas por drogas, organismos que normalmente não são patógenos podem causar doenças. Em outras circunstâncias, a reação inflamatória pode ocorrer frente a tipos diferentes de injúrias, como, por exemplo, o calor, os agentes químicos e as radiações ultravioleta. Além disso, algumas vezes os eventos inflamatórios podem ocorrer contra substâncias que normalmente são inócuas ao organismo (como o pólen) ou mesmo contra os tecidos do próprio corpo (condições auto-imunes). Quando isso acontece, as respostas podem produzir destruição e podem ainda constituir-se parte do processo da doença – tanto de forma aguda, como por exemplo na anafilaxia como de forma crônica, como na asma, na artrite reumatóide ou na aterosclerose. As drogas antiinflamatórias e imunossupressoras são utilizadas exatamente nesses tipos de condições (COLLINS, 1999; RANG *et al.*, 2003).

4. PERMEABILIDADE VASCULAR E EDEMA

As alterações no fluxo e no calibre vascular iniciam-se logo após a injúria e se desenvolvem em níveis variados, dependendo da seriedade desta. Esses eventos foram descritos por COLLINS (1999). Inicialmente, ocorre uma

vasodilatação, que primeiro envolve as arteríolas e, depois, promove a abertura de novos leitos capilares na área. Conseqüentemente há também um aumento do fluxo sanguíneo, que é a causa do calor e do rubor; o tempo de duração da vasodilatação depende do tipo de estímulo. Com o tempo, a velocidade de circulação sanguínea é diminuída devido ao aumento da permeabilidade na microvasculatura, com extravasamento de fluido rico em proteína para o espaço extravascular. A perda de fluido resulta em concentração de glóbulos vermelhos nos vasos pequenos e aumento da viscosidade do sangue, uma condição chamada de estase. Enquanto a estase se desenvolve, os leucócitos, especialmente os neutrófilos, começam a adquirir uma orientação periférica ao longo do endotélio vascular, num processo chamado de marginação leucocitária. Esse fenômeno deve-se à estase sangüínea com redução da força de cisalhamento da parede vascular (COLLINS, 1999; BRITO & RIBEIRO, 1999). Os leucócitos, então, aderem-se ao endotélio, inicialmente de forma transitória (*rolling*), e depois mais avidamente, até, finalmente, migrar através da parede vascular para o tecido intersticial.

O aumento da permeabilidade vascular leva ao escape de fluido rico em proteína (exudato) para o interstício. Isso resulta em diminuição da pressão oncótica intravascular e aumento da pressão oncótica do fluido intersticial. Este fato, juntamente com o aumento da pressão hidrostática causada pela vasodilatação, produz uma marcante saída de fluido intravascular e acúmulo deste nos tecidos, caracterizando a formação de edema.

Como podemos observar, para que ocorram todos estes eventos descritos é fundamental que ocorram alterações no endotélio para explicar as modificações observadas no mesmo. Existem alguns mecanismos que foram

propostos por MAJNO & PALADE (1961) e modificados por COLLINS (1999). O primeiro deles consiste na formação de fendas no endotélio das vênulas. Este é o mecanismo pelo qual histamina, BK, leucotrienos (LT), substância P e vários outros mediadores químicos agem. O aumento de permeabilidade ocorre rapidamente após a exposição ao mediador e consiste em um evento de curta duração (15 a 30 minutos); este mecanismo afeta apenas as vênulas (MAJNO & PALADE, 1961; BOWDEN *et al.*, 1996). Uma outra forma de modificação que pode ocorrer no endotélio é a reorganização do citoesqueleto com retração endotelial, que pode ser induzida *in vitro* por algumas citocinas – como IL-1, TNF- α e interferon- γ (IFN- γ) – por hipoxia e por injúrias sub-letais às células endoteliais. Em contraste ao efeito da histamina, a resposta é normalmente retardada (4 a 6 horas) e de longa duração (24 horas ou mais); ainda permanece incerta a hipótese de que este mecanismo contribua para o aumento da permeabilidade *in vivo* (BRETT *et al.*, 1989). O aumento da trancitose ao longo do citoplasma endotelial também pode contribuir para a modificação do endotélio vascular. Tal trancitose ocorre ao longo de canais que consistem em um agrupamento de vesículas e vacúolos chamados de organelas vesiculo-vacuolares; várias destas estão localizadas próximo às junções intercelulares. Certos fatores, como o fator de crescimento endotelial vascular parecem causar fendas vasculares por aumentar o número e, talvez, o tamanho desses canais. Esse pode ser parte do mecanismo de aumento da permeabilidade vascular induzido pela histamina e outros mediadores químicos (FENG *et al.*, 1996). A injúria endotelial direta pode resultar em necrose da célula endotelial e destacamento. Esse efeito ocorre normalmente devido à destruição direta do endotélio por estímulos, como por exemplo queimaduras

severas ou infecções bacterianas líticas. Todos os níveis de microcirculação são atingidos: vênulas, capilares e arteríolas (COTRAN & BRISCOE, 1997). Um outro mecanismo proposto para a modificação do endotélio consiste em um aumento tardio e prolongado da permeabilidade vascular. Tal aumento inicia-se 2 a 12 horas após o estímulo, dura por várias horas ou mesmo por dias e envolve vênulas e capilares. Injúrias térmicas de intensidade média a moderada, radiação X ou radiação ultravioleta, além de certas toxinas bacterianas, podem formar fendas no endotélio. O mecanismo de ação destes agentes permanece incerto, podendo ser por efeito direto do agente, levando à destruição celular e apoptose ou mesmo por um efeito de citocinas, causando retração endotelial. A injúria endotelial mediada por leucócitos também pode contribuir para a perda de integridade endotelial. Os leucócitos aderem ao endotélio relativamente cedo durante a reação inflamatória. Eles podem ser ativados durante esse processo, liberando espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, que causam injúria endotelial, bem como destacamento das células, resultando em aumento da permeabilidade vascular. As substâncias leucocitárias, como o LTB₄, o 5° componente do sistema complemento (C5a) e o fMLP (N-formyl-met-leu-phe) não foram efetivos em produzir aumento de permeabilidade vascular em animais injetados com mostarda nitrogenada, usada para depletar leucócitos polimorfonucleares (PMN). Isso sugere que, ao contrário de histamina e BK, que aumentam a permeabilidade vascular pela ação direta sobre a célula endotelial, as substâncias LTB₄, C5a e fMLP agem somente na presença de leucócitos PMN. Apesar de os leucócitos PMN estarem presentes em grande quantidade no tecido, depois de várias horas do início da resposta inflamatória, evidências

sugerem que essas células interagem com o endotélio vascular para regular a permeabilidade poucos minutos após o estímulo inflamatório (WEDMORE & WILLIAMS, 1981). Além disso, durante o reparo, muitas células endoteliais proliferam formando novos vasos sanguíneos (angiogênese). Esses novos vasos permanecem com fendas até que haja diferenciação das células endoteliais, formando as junções intercelulares.

Embora estes mecanismos tenham sido descritos separadamente, todos podem atuar em conjunto frente a um único estímulo (COLLINS, 1999).

A histamina é largamente distribuída nos tecidos, e é proveniente principalmente dos mastócitos, que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. A histamina está também presente nos basófilos e plaquetas. Os grânulos dos mastócitos contêm uma grande quantidade de histamina pré-formada; ela é liberada durante o processo de degranulação, que ocorre em resposta a vários estímulos: injúria física, como trauma, frio ou calor; reações imunes envolvendo a ligação de anticorpos aos mastócitos; fragmentos do sistema complemento (anafilatoxinas- C5a e 3° componente do sistema complemento – C3a); proteína liberadora de histamina, derivada dos leucócitos; neuropeptídeos (substância P) e algumas citocinas (IL-1, IL-8). Em humanos, a histamina causa dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular de vênulas. A histamina é, então, considerada como o principal mediador da fase imediata do aumento de permeabilidade vascular, causando fendas entre as células endoteliais venulares. A histamina age na microcirculação principalmente via receptores do tipo H₁ localizados nas células endoteliais (COLLINS, 1999). Estudos em tecidos intactos e em células endoteliais em cultura demonstraram que a ligação da histamina ao receptor

resulta em mudança de forma (contração) da célula endotelial e em formação de espaços de 1 μm de diâmetro entre células adjacentes; esses espaços levam ao extravasamento de macromoléculas. A estimulação de receptores H_1 em células umbilicais humanas em cultura está associada à hidrólise de fosfatidilinositol e aumento do cálcio intracelular proveniente, inicialmente dos estoques intracelulares, mas posteriormente do meio extracelular. O fato de a citocalasina B (proteína que inibe a polimerização da actina) inibir o aumento da permeabilidade vascular induzido por histamina sugere que a contração da célula endotelial é essencial para a obtenção deste efeito. Agentes que aumentam os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) intracelular, como os agonistas β -adrenérgicos, as metilxantinas e a prostaglandina E_1 (PGE_1) revertem efetivamente a permeabilidade vascular induzida pela histamina (GALLIN *et al.*, 1992).

A histamina também é capaz de fazer com que as células endoteliais sintetizem substâncias relaxantes para a musculatura lisa vascular, como a prostaciclina e o NO (LUKACS *et al.*, 1996).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é também um mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às aquelas descritas para a histamina. A serotonina está presente nas plaquetas, nas células enterocromafins e também nos mastócitos em roedores, mas não em humanos.

A liberação de serotonina (e de histamina) das plaquetas é estimulada durante a agregação plaquetária, após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. A agregação e liberação plaquetária de serotonina e de histamina é também

estimulada pelo fator de agregação plaquetária (PAF), derivado dos mastócitos, durante as reações mediadas por imunoglobulina-E (Ig-E). Sendo assim, a reação de liberação das plaquetas resulta em aumento de permeabilidade vascular durante as reações imunológicas (COLLINS, 1999).

A BK é um cininogênio vasoativo (nonapeptídio) de alto peso molecular que apresenta um potente efeito sobre a permeabilidade vascular. Seus efeitos são similares aos da histamina. A BK é um importante mediador da resposta inflamatória tecidual a estímulos irritantes, porém sua ação é de curta duração, pois ela sofre uma rápida inativação enzimática. A degradação enzimática pode ser feita por várias peptidases, incluindo a dipeptidil carboxipeptidase cininase II. Esta enzima é a mesma enzima conversora que hidrolisa a angiotensina I em angiotensina II (BOURA & SVOLMANIS, 1984).

As PGs, especialmente a PGI₂, têm efeito sinérgico com outros mediadores em induzir aumento de permeabilidade vascular e edema. PGs exógenas sozinhas são indutores fracos de edema em algumas espécies como cobaia (WILLIAMS & MORLEY, 1973) e coelho (WILLIAMS & PECK, 1977), enquanto em rato (CRUNKHORN & WILLIS, 1971) e no homem (BASRAN *et al.*, 1982) elas induzem edema de forma mais acentuada. No entanto, apesar da diferença entre as espécies, PGs da série E liberadas de células ou geradas de precursores humorais no sítio da inflamação são sinérgicas com outros mediadores, potenciando os efeitos pró-inflamatórios (WILLIAMS & PECK, 1977; WILLIAMS & JOSE, 1981; BASRAN *et al.*, 1982; BUCKLEY *et al.*, 1991).

A fonte endógena de PGs durante a inflamação aguda ainda não está totalmente esclarecida. Todavia, as células endoteliais são prováveis candidatas. Adicionalmente, outras células, como macrófagos e neutrófilos

presentes no tecido conjuntivo perivascular, podem também contribuir para a produção dessas PGs (DAVIES & MacINTYRE, 1992).

5. A BIOLOGIA DOS MASTÓCITOS

Os mastócitos são células inflamatórias derivadas de progenitores presentes na medula óssea, porém são amplamente distribuídos nos tecidos e podem liberar mediadores que apresentam efeitos imediatos e crônicos (ZHONG *et al.*, 2001). Na espécie humana, os mastócitos são encontrados em grande número nas adjacências dos vasos sanguíneos ou dos vasos linfáticos, sendo também predominantes na superfície da pele e nas mucosas geniturinária, gastrointestinal e do trato respiratório (ABBAS *et al.*, 2000). Estima-se que a concentração de mastócitos seja de aproximadamente 500 a 4000 por mm^3 no pulmão, 7000 a 12000 por mm^3 na pele e de 20000 por mm^3 no trato gastrointestinal (GALLI, 1993). Os mastócitos são células ricas em fatores de crescimento que infiltram os tecidos injuriados, onde têm sido implicados na patogênese da fibrose progressiva. A infiltração de mastócitos e a expressão de citocinas em seus grânulos são importantes quando se trata de injúria renal, podendo tais células contribuir para a patogênese da injúria renal (JONES *et al.*, 2003).

Os mastócitos expressam em sua membrana superficial receptores para IgE – Fc ϵ RI e Fc ϵ RII/CD3 (respectivamente de alta e baixa afinidade por IgE) e para componentes do sistema complemento, especialmente para C3a e C5a (BUKU *et al.*, 2001; RANG *et al.*, 2003). Os mastócitos estão envolvidos com as reações anafiláticas a alimentos, drogas ou venenos de animais; nestas

reações agudas, os anticorpos IgE ligam-se aos receptores específicos, promovendo degranulação celular e liberando, então, uma grande quantidade de mediadores (COLLINS, 1999).

Há bastante tempo, os mastócitos têm sido considerados células efetoras críticas durante as doenças alérgicas mediadas por IgE e durante as respostas imunes aos parasitas. Porém, FROSSI e cols (2004) sugerem que essa afirmativa a respeito da função dos mastócitos é incompleta e que tal afirmativa não considera o complexo papel desempenhado pelos mastócitos durante a imunidade adaptativa e inata. Isso gera uma nova visão a respeito da regulação das respostas imunes e do desenvolvimento das doenças auto-imunes.

RIBEIRO e cols (1997) demonstraram que os mastócitos podem ser estimulados sem, no entanto, sofrerem degranulação; nesse estudo, mastócitos estimulados por LTB₄ produziram um fator quimiotático para neutrófilos sem haver degranulação.

Além de promoverem amplificação da inflamação aguda, os mastócitos são responsáveis pela secreção de um grande número de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a manutenção de estados inflamatórios crônicos, como úlcera intestinal, artrite reumatóide, cistite intersticial, escleroderma e doença de Crohn (ABRAHAM & MALAVIYA, 1997).

Uma vez estimulados por IgE via Fc ϵ RI ou de forma não específica por outra proteína, os mastócitos, células altamente especializadas na síntese e secreção de substâncias farmacologicamente ativas, liberam uma grande quantidade de mediadores químicos. Estas substâncias podem ser divididas em duas classes: os mediadores pré-formados, tais como histamina, serotonina

(RANG *et al.*, 2003) e uma pequena quantidade de TNF- α (BEIL *et al.*, 1994; BEIL *et al.*, 1996; SCHMIDT-CHOUDHURY *et al.*, 1996) e os mediadores oriundos da chamada síntese “de novo”; os LTs (LTB₄, LTC₄), as PGs (PGD₂), as citocinas (TNF- α e ILs 3, 4, 5, 6, 8) e quimiocinas (MIP-1 e CINC-1 e 13) fazem parte desta segunda classe (BANKS & COLEMAN, 1996; BIEDERMANN *et al.*, 2000; WAKAHARA *et al.*, 2001; ZHONG *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Além destes mediadores, os mastócitos podem também liberar superóxidos (FUKUIISH *et al.*, 1997).

Os mastócitos são células capazes de gerar e secretar mediadores que podem provocar mudanças vasculares e alterações celulares; estas células podem afetar alguns fatores do plasma, bem como induzir migração de neutrófilos nas primeiras horas e de eosinófilos após 24 horas (OLIANI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Os produtos de ativação dos mastócitos podem ser liberados por diferentes mecanismos de exocitose dependendo do tipo de agonista (ABRAHAM & MALAVIYA, 1997).

DVORAK (1997) revelou dois mecanismos básicos de exocitose de mastócitos: o mecanismo de liberação lenta dos mediadores e o mecanismo de liberação rápida, também conhecido como degranulação anafilática. O mecanismo de liberação lenta consiste em um esvaziamento lento dos grânulos, com ausência de fusão intergranular. Já o segundo mecanismo é descrito como explosivo, constituído de eventos de secreção rápida que se completam minutos após a estimulação e parecem ser iniciados pela fusão coordenada dos grânulos com concomitante secreção de mediadores através da degranulação intracitoplasmática (DVORAK, 1997).

Os passos bioquímicos que envolvem a degranulação anafilática são apenas parcialmente conhecidos; supõe-se que a ligação cruzada das IgEs ao antígeno ative uma proteína G de ligação a GTP, que, por sua vez, provoca a ativação de uma PLC específica para o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2). Essa enzima catalisa a liberação de trifosfato de inositol (IP_3) e de diacilglicerol (DAG) do PIP_2 de membrana. O IP_3 promove a liberação do cálcio intracelular do retículo endoplasmático. Cálcio e DAG combinam-se com fosfolipídeos de membrana para a ativação da proteína quinase. Com o aumento da concentração citoplasmática de cálcio, ocorre ativação de enzimas, como a PLA_2 ; além disso, o complexo cálcio-calmodulina é capaz de ativar a quinase de cadeia leve de miosina. Nos mastócitos, o resultado desta ativação é a geração de mediadores lipídicos, como as PGs e LTs bem como a exocitose dos grânulos. (ABBAS *et al.*, 2000).

Os mastócitos são heterogêneos, ou seja, nem todas as células liberam os mesmos mediadores ou o mesmo conjunto de mediadores. Os seus grânulos contêm mediadores vasoativos não-lipídicos de baixo peso molecular, sendo a histamina o protótipo desse tipo de mediador; no entanto, em certos roedores, como no rato, a serotonina pode ter importância igual ou superior (GALLI, 1993). Os grânulos dos mastócitos contêm também diversas enzimas, (serino-proteases, aril-sulfatase) e também os proteoglicanos (heparina, sulfato de condroitina) (ABBAS *et al.*, 2000).

Além dos mediadores não-lipídicos, há, ainda, três classes de mediadores lipídicos sintetizados pelos mastócitos quando estes são ativados. Em geral, estas reações de síntese são iniciadas pela PLA_2 que promove a liberação dos substratos de fosfolipídeos precursores armazenados nos corpos

lipídicos. O primeiro mediador lipídico descrito foi a PGD_2 , que se liga a receptores localizados nas células da musculatura lisa, atuando como agente vasodilatador e broncoconstrictor. Uma segunda classe de mediadores derivados do ácido aracdônico provenientes da degranulação de mastócitos são os LTs, sendo os principais o LTC_4 , o LTD_4 , o LTE_4 e, em menores proporções, o LTB_4 . O terceiro mediador lipídico produzido por basófilos e, provavelmente, pelos mastócitos, é o PAF, que tem importância particular nas reações de fase tardia, onde atua ativando leucócitos (GALLI, 1993).

Os mastócitos estão também relacionados à síntese de citocinas. GALLI e cols (1993) demonstraram que a estimulação *in vitro* de mastócitos de ratos por $Fc\epsilon RI$, ou mesmo por outros mecanismos, induz o aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm), uma maior secreção de substâncias pró-inflamatórias e, também, o surgimento de citocinas mitogênicas, como as interleucinas 1, 3, 4 e 6; além disso, há uma elevação nos níveis $IFN-\lambda$, de membros da família das integrinas e de $TNF-\alpha$. Relata-se também a síntese de MIP-1e das interleucinas 5, 8/CINC-1 e 13 por mastócitos ativados (BANKS & COLEMAN, 1996; BIEDERMANN *et al.*, 2000; WAKAHARA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Em conjunto, essas citocinas regulam não só a produção de IgE, mas também a resposta inflamatória, a hemostasia, a hematopoiese, a angiogênese, a remodelação tecidual, dentre outros (GALLI, 1993). Além disso, os mastócitos têm sido implicados em várias doenças correlacionadas com a neovascularização; o exato mecanismo para explicar esse fato ainda não foi bem elucidado, porém, GRÜTZKAU (1998) estudou os mastócitos da linhagem de pele humana HMC-1 e constatou que estas células

eram capazes de sintetizar, estocar e secretar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de permeabilidade vascular (VPF).

Portanto, os mastócitos são considerados células amplificadoras da reação inflamatória por liberarem e por estimularem a produção de muitos dos mediadores químicos de tal processo; estes mediadores, por sua vez, podem atuar aumentando a permeabilidade vascular ou mesmo contribuindo para a migração e ativação de leucócitos durante a fase mais tardia da inflamação.

6. EVENTOS CELULARES DA INFLAMAÇÃO

Uma função primordial do processo inflamatório consiste em levar os leucócitos ao sítio da injúria. Os leucócitos, por sua vez, fagocitam agentes lesivos, matam bactérias e outros micróbios além de degradarem tecidos necróticos e antígenos estranhos (BEVILACQUA *et al.*, 1994; COLLINS, 1999). No entanto, os leucócitos podem também prolongar a inflamação e induzir dano tecidual pela liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio (COLLINS, 1999).

A seqüência de eventos que ocorrem durante a jornada dos leucócitos do lúmen para o tecido intersticial – extravasamento – foi didaticamente dividida por COLLINS (1999) nos seguintes passos a saber: marginação, *rolling* e adesão, que ocorrem ainda no lúmen do vaso; transmigração através do endotélio (diapedese) e, finalmente, migração nos tecidos intersticiais em direção a estímulos quimiotáticos.

Como resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, o fluxo sanguíneo torna-se lento e isso faz com que os leucócitos

assumam uma posição periférica ao longo da superfície endotelial, fenômeno este chamado de marginação leucocitária. A partir daí, células leucocitárias individuais ou em fileiras tombam vagarosamente ao longo do endotélio e aderem de forma transitória (*rolling*). Forma-se, então, em vários pontos, adesões mais firmes entre leucócitos e células endoteliais. Após o estabelecimento destas adesões firmes, os leucócitos inserem pseudópodes em direção às junções intercelulares, apertam-se entre estas junções, assumindo uma posição entre a célula endotelial e a membrana basal. Finalmente, os leucócitos atravessam a membrana, escapando para o espaço extravascular. Neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos utilizam essa mesma via (COLLINS, 1999).

Atualmente, sabe-se que a adesão e a transmigração leucocitária são dependentes da ligação de moléculas de adesão à superfície dos leucócitos e das células endoteliais. Além disso, os mediadores químicos (agentes quimiotáticos e certas citocinas) são capazes de influenciar este processo; isso porque estas substâncias modulam a expressão das superfícies de adesão e a avidéz das moléculas de adesão (LIPOWSKY, 1996; SPRINGER, 1994). As moléculas de adesão envolvidas nesse processo dividem-se em quatro famílias – as selectinas as imunoglobulinas, as integrinas e as glicoproteínas com afinidade por mucina (COLLINS, 1999).

As selectinas são assim chamadas, pois são caracterizadas por um domínio N-terminal extracelular – domínio lectínico. Há vários tipos de selectinas: selectina-E, que está presente no endotélio; selectina-P, presente no endotélio e nas plaquetas e selectina-L, presente em vários tipos de leucócitos. As selectinas ligam-se, através de seu domínio lectínico, aos

oligossacarídeos que apresentam porções siálicas (por exemplo, *Sialyl-Lewis X*), que estão presentes na superfície dos leucócitos. O principal papel da selectina-P é promover o processo de *rolling* dos neutrófilos, monócitos e linfócitos. Já a selectina-E , além de promoverem o *rolling*, promovem a adesão ao endotélio ativado para neutrófilos, monócitos e células T (BRITO *et al.*, 1997; COLLINS, 1999).

A família das imunoglobulinas inclui duas moléculas de adesão endotelial: molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Ambas interagem com as integrinas dos leucócitos. A molécula ICAM-1 é responsável, principalmente, pelos processos de adesão e de transmigração dos leucócitos; já VCAM-1 participa apenas do processo de adesão, em especial de eosinófilos, monócitos e linfócitos (POBER & COTRAN, 1990; COLLINS, 1999).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembrana; os principais receptores para ICAM-1 são as β integrinas LFA-1 e MAC-1 (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) e para VCAM-1 são as integrinas $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) e $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1) (COLLINS, 1999).

O tipo de leucócito que migra para o espaço perivascular varia com a fase em que a lesão inflamatória se encontra e com o tipo de estímulo inflamatório. Na maior parte das formas de inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado durante as primeiras 6 a 24 horas, quando são, então, substituídos por monócitos nas próximas 24 a 48 horas. Essa seqüência pode ser explicada de forma mais clara pela ativação de diferentes pares de moléculas de adesão, ou de fatores quimiotáticos específicos nas diversas fases da inflamação. Além disso, os neutrófilos apresentam vida curta,

sofrendo apoptose e desintegrando-se após 24 a 48 horas, ao passo que os monócitos têm uma maior sobrevivência (THURESON-KLEIN *et al.*, 1984; MIGLIORISI *et al.*, 1987; COLLINS, 1999; BRITO & RIBEIRO, 1999). No entanto, existem exceções a esse padrão de infiltrado celular; em certas infecções, como aquelas produzidas por *Pseudomonas organisms*, em que os neutrófilos predominam por 2 a 4 dias. Além disso, nas infecções virais, os linfócitos podem ser as primeiras células a chegar no sítio da inflamação (COLLINS, 1999).

Após o extravasamento, os leucócitos migram nos tecidos em direção ao sítio da injúria por um processo chamado de quimiotaxia. A quimiotaxia consiste em uma locomoção orientada por um gradiente químico. Todos os granulócitos, monócitos e, em menor extensão, os linfócitos respondem a um estímulo químico em grau variado de velocidade (COLLINS, 1999; BRITO & RIBEIRO, 1999).

Existem agentes quimiotáticos de natureza endógena e de natureza exógena. Os agentes exógenos mais comuns são os produtos bacterianos; a maior parte desses produtos bacterianos contém um aminoácido terminal do tipo N-formil-metionina, enquanto a minoria apresenta natureza lipídica. Os mediadores químicos endógenos incluem componentes do sistema complemento (em especial C5a), produtos da via da lipoxigenase (principalmente o LTB₄) e citocinas (particularmente aquelas da família das quimiocinas, como IL-8). A ligação de agentes quimiotáticos a receptores específicos na membrana celular dos leucócitos resulta em ativação da PLC (mediada por proteína G), o que leva à hidrólise do PIP₂ a IP₃ e DAG, além da liberação de cálcio das reservas intracelulares e, mais adiante, do influxo de

cálcio extracelular. O aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva à interação entre actina e miosina no pseudópode para promover a locomoção (SNYDERMAN & UHUIG, 1992; STOSSEL, 1993; COLLINS, 1999).

7. ANGIOTENSINA II E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Várias pesquisas têm sugerido que o SRA participa de respostas imunológicas e inflamatórias. Segundo a maioria dos estudos, a Ang II está envolvida em vários passos do processo inflamatório através da ação sobre os receptores AT1 e AT2, como quimiotaxia e proliferação celular através da estimulação de células mononucleares, regulação do recrutamento de células pró-inflamatórias para o sítio da injúria (mediada pela expressão de fatores que interferem na permeabilidade vascular, moléculas de adesão e quimiocinas pelas células residentes) e produção de Ang II pelas células residentes inflamatórias, contribuindo, assim, para a perpetuação da destruição tecidual (RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000; SUZUKI *et al.*, 2000; SADOSHIMA, 2000; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001; BATALLER *et al.*, 2003).

Alterações como a hipertensão e a aterosclerose estão associadas à presença de um processo inflamatório na parede dos vasos sanguíneos (BUSH *et al.*, 2000). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que a Ang II desempenha um papel crítico na patogênese destas condições. Os mecanismos envolvidos incluem: vasoconstrição, ativação da transmissão adrenérgica simpática, aumento da liberação de aldosterona, produção de estresse oxidativo e indução da adesão entre os leucócitos e as células endoteliais (GRAFE *et al.*; 1997; CHENG *et al.*, 1999; MERVAALA *et al.*, 1999;

PIQUERAS *et al.*, 2000). Muitos estudos a respeito das alterações cardiovasculares relatam a existência de um *link* entre a ativação do SRA e os eventos isquêmicos cardiovasculares. O acúmulo de leucócitos na parede vascular é um sinal precoce de aterosclerose. Selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 são moléculas de adesão que participam das interações entre leucócitos e células endoteliais cujas expressões foram detectadas nas placas ateroscleróticas. GRAFE e cols (1997) investigaram o papel da Ang II sobre a expressão endotelial de selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 *in vitro*. Em células endoteliais coronárias, a Ang II aumentou a expressão de selectina-E de forma estatisticamente significativa. No entanto, em células endoteliais da microvasculatura cardíaca, Ang II induziu apenas um pequeno aumento da expressão de selectina-E. VCAM-1 e ICAM-1 não foram afetadas pela estimulação de Ang II. Além disso, Ang II aumentou a adesão de leucócitos de forma significativa e dependente de selectina-E. Ao final do estudo, os autores concluíram ainda que os receptores AT1 medeiam os efeitos da Ang II sobre a expressão de selectina-E e sobre a adesão leucocitária em células endoteliais coronárias.

Dados científicos demonstram que Ang II induz interações *in vivo* entre leucócitos e células endoteliais mediadas pela *up-regulation* de selectina-P via receptores AT1 e AT2. PIQUERAS e cols (2000) observaram as vênulas pós-capilares de mesentérios de ratos através de microscopia intravital. A infusão de Ang II induziu um aumento significativo do fluxo, do *rolling*, da adesão e da transmigração de leucócitos sem, no entanto, haver qualquer atividade de vasoconstrição. O tratamento intravenoso com o antagonista de receptores AT1, o LOS ou com o antagonista de receptores AT2, o PD123319,

reduziu significativamente o efeito da Ang II. O pré-tratamento com o anticorpo monoclonal anti selectina-P de rato aboliu o efeito da Ang II sobre os leucócitos. Além disso, os autores provaram que tais efeitos da Ang II não são mediados pela ativação de mastócitos, já que um grupo de animais foi pré-tratado, antes do início da cirurgia, com cromoglicato de sódio, um agente estabilizador de mastócitos. Concluiu-se, então, que doses sub-vasoconstrictoras de Ang II promovem interações entre leucócitos e células endoteliais na microcirculação mesentérica de ratos *in vivo*. Tal efeito é mediado por receptores AT1 e AT2, sendo totalmente dependente da expressão de selectina-P pelas células endoteliais. Ang II pode ter um papel crítico sobre a adesão e a transmigração de leucócitos através do endotélio vascular, e isso pode contribuir para a destruição vascular presente em condições patológicas nas quais os níveis plasmáticos de Ang II estão elevados.

KIM e cols (1996) trataram células endoteliais provenientes da aorta humana e de coelhos com Ang II durante 18 horas e demonstraram indução da adesão de monócitos, mas não de neutrófilos, a estas células. Tal indução foi reduzida por inibidores dos receptores tipo 1 e 2 da Ang II. Além disso, a indução da ligação entre monócitos e células endoteliais não foi associada à indução de selectina-E, VCAM ou ICAM.

WILLIAMS e cols (1995) investigaram um outro mecanismo pelo qual a Ang II poderia interferir na patogênese da aterosclerose. Estes autores demonstraram, então, que as células da musculatura lisa vascular humana expressam RNAm para VEGF e VPF. A Ang II induziu de forma bastante significativa a expressão de VPF, sendo esta indução bloqueada por LOS,

antagonista dos receptores AT1 da Ang II. Isso sugere que os receptores AT1 medeiam a ação da Ang II em promover a indução do fator de permeabilidade vascular nas células da vasculatura muscular lisa.

WU e cols (2001) investigaram o papel de AT1 e AT2 no desenvolvimento da aterosclerose. Eles examinaram os efeitos de um antagonista seletivo para receptores AT1 sobre a injúria vascular em camundongos que apresentavam, ou não, receptores AT2. Ao final do estudo, os autores concluíram que o bloqueio de AT1 diminui a resposta inflamatória desenvolvida com a aterosclerose e que este efeito não diz respeito apenas ao bloqueio dos receptores AT1, mas também ao estímulo de receptores AT2 pela Ang II formada.

Inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores da Ang II eram inicialmente conhecidos pelo uso na hipertensão, na insuficiência cardíaca e após infarto do miocárdio. Evidências novas, particularmente com os inibidores da ECA, têm demonstrado sua capacidade em reduzir os eventos inflamatórios agudos relacionados com a aterosclerose. Isso se deve provavelmente ao efeito inibitório sobre o SRA, que influencia adversamente eventos-chave para a progressão da aterosclerose, como o balanço fibrinolítico, a função das células endoteliais vasculares e a inflamação na parede vascular (TSIKOURIS & COX, 2003).

TAMARAT e cols (2002) estudaram os mecanismos envolvidos com o efeito pró-angiogênico da Ang II em estudo *in vivo*; Ang II induziu angiogênese através do receptor AT1 e este processo está envolvido com a ativação de vias dependentes de VEGF e NO e também com o processo inflamatório.

A Ang II também funciona como mediador pró-inflamatório na destruição renal (RUYZ-ORTEGA *et al.*, 2001). Em vários modelos de injúria renal, independente da presença de hipertensão, foi descrita a ativação do SRA. Antagonistas dos receptores AT1 da Ang II e inibidores do SRA têm sido utilizados no tratamento da hipertensão e da proteinúria (ANDERSEN *et al.*, 2000).

Os mecanismos moleculares envolvidos com os processos de injúria renal ainda não foram completamente esclarecidos, embora se saiba que as células inflamatórias desempenham um papel chave. MEZZANO e cols (2003), através de biópsia renal de pacientes com nefropatia diabética, investigaram a correlação entre os parâmetros inflamatórios e a injúria renal. Para isso, foram feitas análises através de ensaios de imunohistoquímica ou de hibridização para detecção *in situ* de NF κ B ativado ou da expressão de MCP-1 ou de RANTES (do inglês *regulated upon activation: normal T cell expressed/secreted*), cujos genes são regulados por NF κ B. Os níveis de ECA e de Ang II apresentaram-se elevados nas células tubulares e intersticiais. Houve *down-regulation* de receptores AT1 e *up-regulation* de receptores AT2. NF κ B apresentou-se ativado, promovendo, *up-regulation* das citocinas envolvidas com este fator. Observou-se uma correlação entre níveis elevados de Ang II, quimiocinas e NF κ B com a proteinúria e a infiltração intersticial detectadas. De acordo com esses resultados, na nefropatia diabética humana, componentes do SRA estão presentes nos compartimentos renais, promovendo uma elevada produção local de Ang II, com ativação das células tubulares e indução de parâmetros pró-inflamatórios, sugerindo a participação da Ang II no processo inflamatório.

A inibição de NF- κ B reduz a inflamação induzida por Ang II (MULLER *et al.*, 2000; SADOSHIMA, 2000; THEUER *et al.*, 2002). MULLER e cols (2000) testaram a hipótese de que o antioxidante *pyrrolidine dithiocarbamate* (PDTC) inibe NF κ B, diminuindo, assim, a destruição renal e cardíaca. O ensaio de “*electrophoretic mobility shift*” demonstrou aumento da atividade do DNA de NF κ B no coração e no fígado de ratos duplamente transgênicos para os genes de renina e angiotensinogênio (dTGR). O tratamento crônico com PDTC diminuiu a PA em ratos dTGR em relação ao grupo controle. O índice de hipertrofia cardíaca também foi significativamente reduzido. PDTC reduziu a albuminúria em mais de 95% e preveniu a morte. A injúria vascular foi diminuída nos pequenos vasos renais e cardíacos. Sendo assim, os resultados deste estudo demonstram que PDTC inibe a atividade de NF κ B, atenuando a inflamação e protegendo contra a destruição final do órgão induzida pela Ang II.

Em células da musculatura lisa vascular, Ang II aumentou a geração de superóxidos através de vias dependentes de fosfolipase D (PLD) e de NADH/NADPH oxidases (TOUYZ & SCHIFFRIN, 1999). As espécies reativas de oxigênio são capazes de ativar NF- κ B e o fator ativador de proteína-1 (AP-1), promovendo a codificação de genes de várias moléculas importantes no processo inflamatório: moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas, fatores de coagulação, dentre outras (SADOSHIMA, 2000; LUFT, 2001; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001). Segundo DIEP e cols (2002), o efeito da Ang II no desenvolvimento da hipertensão, de anormalidades estruturais e na disfunção endotelial está associado com a geração de estresse oxidativo e com a inflamação na parede do vaso.

KLETT e cols (1993) afirmaram que o angiotensinogênio é uma proteína de fase aguda; isso porque sua concentração plasmática aumenta durante várias formas de inflamação aguda. Macrófagos presentes em granulomas de ratos liberam ECA, que produz Ang II que, por sua vez, modula a atividade de monócitos/macrófagos, amplificando a resposta inflamatória (SIMON *et al.*, 1991). Além disso, o LPS elevou a concentração hepática de RNAm para angiotensinogênio, bem como, a concentração plasmática de angiotensinogênio; este processo foi mediado por um fator derivado de leucócito e por IL-6 (TAKANO *et al.*, 1996). Os receptores AT1 e AT2 da Ang II e a ECA desenvolvem-se seqüencialmente durante a angiogênese no granuloma esponjoso em ratos (WALSH *et al.*, 1997). Interleucina 1 β (IL-1 β), uma importante citocina pró-inflamatória, está envolvida na indução do receptor AT2 durante o processo inflamatório (VISWANATHAN & SAAVEDRA, 1992). Todos esses achados sugerem a possibilidade de expressão de componentes do SRA no sítio da inflamação.

Ang II atenuou a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) na mácula densa do rim em ratos (CHENG *et al.*, 1999). No entanto, OHNAKA e cols (2000) demonstraram que Ang II promove indução da expressão de COX-2 em cultura de células da musculatura lisa vascular de ratos.

Qi e cols (2002) estudaram os efeitos opostos das cicloxigenase 1 (COX-1) e 2(COX-2) na resposta pressora a Ang II; os autores concluíram que COX-1 e COX-2 exercem ações opostas sobre a PA sistêmica e a função renal. Os inibidores da COX-2 reduziram o fluxo sanguíneo medular no rim, diminuíram o fluxo da urina e potenciaram o efeito pressor da Ang II. No entanto, este efeito pressor a Ang II foi atenuado pela inibição de COX-1.

Embora o papel da Ang II e seus inibidores já tenha sido reportado em condições inflamatórias crônicas, como Colite de Crohn's, artrite reumatóide, inflamações granulomatosas e aterosclerose (MARTIN *et al.*, 1984; WEINSTOCK *et al.*, 1981; MAVRIKAKIS *et al.*, 1996; HIRAYAMA *et al.*, 1990; JASZEWSKI *et al.*, 1990), seu papel na resposta inflamatória aguda não foi, ainda, bem esclarecido.

RAGHAVENDRA & KULKARNI (2000) estudaram o efeito da administração local de Ang II, Captopril ou LOS no modelo de edema de pata induzido por carragenina (Cg) em ratos. Os autores constataram que a administração local dessas drogas potencializou de forma dose-dependente o edema de pata da Cg. Assim, a geração local de Ang II estaria relacionada com processos inflamatórios, uma vez que este estudo demonstrou que componentes do SRA, particularmente Ang II, inibidores da ECA e bloqueadores de receptores AT1, influenciaram o processo inflamatório agudo induzido pela Cg.

BOURA & SVOLMANIS (1984) também estudaram os mecanismos envolvidos com o efeito do Captopril em potencializar o edema de pata da Cg. O edema de pata da Cg foi significativamente aumentado com a inibição da ECA, uma enzima do tipo cininase II, por Captopril. Além disso, o edema promovido por dose submáxima de BK foi também significativamente aumentado por Captopril, ao passo que o edema produzido em resposta a histamina ou PGE₂ foi inalterado, mostrando que o Captopril pode potencializar a inflamação em ratos causada por vários, mas não por todos os estímulos inflamatórios. A potenciação por Captopril do edema da Cg ou da BK foi reduzida pela administração prévia de Indometacina, sugerindo que, ao potencializar o efeito de

Cg e BK, o Captopril provavelmente induz síntese e liberação de prostaglandinas. A atividade da cininase II tissular é normalmente suficiente para diminuir a resposta inflamatória gerada por Cg ou por BK; no entanto, após a inibição desta enzima por Captopril, os níveis de BK aumentaram, o que está relacionado com a liberação concomitante de PGs e com a potenciação da inflamação. FERREIRA e cols (1974) já haviam demonstrado a liberação sinérgica de BK e PGs durante a resposta inflamatória a Cg.

II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A Ang II é o principal peptídeo efetor do SRA. Diversos estudos têm abordado a influência deste peptídeo sobre a regulação da PA e do equilíbrio hidro-eletrolítico. Além disso, alguns autores sugerem que a Ang II tem papel fundamental no curso de respostas imunológicas e inflamatórias através de seus receptores AT1 e AT2. Muitos trabalhos abordam o papel da Ang II em condições inflamatórias crônicas, como Colite de Crohn's, artrite reumatóide e, especialmente, aterosclerose. No entanto, pouco se sabe a respeito da participação da Ang II em inflamações agudas. Sendo assim, espera-se com este estudo contribuir para o conhecimento dos mecanismos através dos quais a Ang II participa do processo inflamatório. Além disso, espera-se fundamentar futuras investigações clínicas acerca dos efeitos dos ligantes de receptores AT1 e AT2 da Ang II no tratamento de condições inflamatórias.

Para tanto, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o papel da Ang II em modelos experimentais de inflamação aguda.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Investigar o efeito da Ang II em modelo de edema de pata em ratos induzido por Cg e por dextran (DXT);
2. Avaliar a participação dos receptores AT1 e AT2 da Ang II na modulação do edema de pata em ratos;
3. Estudar o papel da Ang II sobre migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos estimulada pela Cg;
4. Investigar o efeito da Ang II sobre o aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) induzido por Cg na pata de ratos;

5. Investigar o papel da Ang II sobre o aumento da produção de citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ induzida pela Cg;
6. Estudar o papel da Ang II na degranulação de mastócitos induzida pelo DXT na pata ou pelo composto 48/80 no mesentério de ratos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* de ambos os sexos, pesando 180-200g provenientes do Biotério Central do Campus do Pici e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram acondicionados em caixas de plástico, forradas com raspa de madeira e receberam água e ração *ad libitum* até o início dos experimentos. Durante os experimentos os animais ficaram em jejum com livre acesso à água.

O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

O tratamento dispensado aos animais estava de acordo com o "Guia de Cuidados em Uso de Animais de Laboratório" do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- Pletismômetro Ugo-Basile 7140;
- Balança Analítica Ohaus AS2600;
- Balança Analítica Marte AL200;
- Centrífuga Eppendorf 5804R;
- Citocentrífuga Revan 2000D;
- Microscópio Óptico (MO) binocular Nikon Alphaphot 2 VS2;

- MO binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus;
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N;
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys;
- Autoclave;
- Estufa Olidex cz;
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²);
- Agulhas fenestradas 10x5 (Pentalance), 25x7 (B-D Precision Glide);
- Lâminas para microscopia;
- Lamínulas;
- Papel de filtro qualitativo;
- Alicates para deslocamento cervical;
- Seringas de 1,3,5,10 e 20mL (B-D Plastipak);
- Tubos de ensaio;
- Micropipetas Gilson de 2, 10, 20, 100, 200 e 1000 μ L;
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma;
- Material cirúrgico (pinças, tesouras e bisturis);
- Capela de fluxo laminar Vico Biosafe Plus Classe II tipo A;
- Provetas graduadas;
- Tubos de polipropileno para centrífuga (15 e 50mL);
- Espátulas de aço;
- Béqueres;
- Balões volumétricos;
- Placas de Petri;
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8 e Dispergierstation T8.10 da Ika Labortechnik;

- Micrótomo Olympus.

3. DROGAS, SOLUÇÕES, CORANTES E ANTISOROS

3.1. DROGAS

- Carragenina (FMC): sal não purificado dissolvido em salina estéril 0,9%;
- Dextran (Sigma): dissolvida em salina estéril 0,9%;
- Angiotensina II (Sigma) : dissolvida em Sal estéril 0,9%;
- CGP 42112A (Sigma) : dissolvido em Sal estéril 0,9%;
- Losartan (Merck) : dissolvido em Sal estéril 0,9%;
- Composto 48/80 (Sigma) : dissolvido em Sal estéril 0,9%;
- Mepiramina (MEP) (Sigma) : dissolvida em Sal estéril 0,9%;
- Metisergida (MET) (Sigma) : dissolvida em Sal estéril 0,9%;
- Éter etílico (Synth);
- fMLP (Sigma): dissolvido em PBS estéril a partir de uma solução de estoque de 10^{-2} M em dimetilsulfoxide (DMSO);
- Heparina (Cristália- Brasil);
- Formamida (Reagen);
- L-Metionina-sulfoximina (Sigma);
- Xilol (Reagen);
- Peróxido de hidrogênio (Smith);
- Avidina-peroxidase (DAKO);
- O-fenilenediamina diidrocloro (OPD-Sigma) dissolvido em tampão substrato descrito no protocolo de ELISA.

3.2. CORANTES

- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merck);
- Corante rápido HEMA 3;
- Corante de Turk:

Ácido acético glacial (Synth)20,0 mL;

Violeta de genciana2,0 mL;

Água destilada1,0 L;

- Azul de Toluidina:

Azul de Toluidina.....100,0 mg;

Álcool Etílico P.A.70,0 mL;

Água Destilada.....30,0 mL;

O pH foi ajustado para 1.8 a 2.0 com HCl (5mL/L).

3.3. SOLUÇÕES

- Salina tamponada com fosfato (PBS):

Cloreto de sódio (Synth)8,00 g;

Cloreto de potássio (Synth)0,20 g;

Fosfato de sódio dibásico (Synth)1,15 g;

Fosfato de sódio monobásico (Synth).....0,20 g;

Água destilada1,00 L;

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 0,1N.

- Tampão de bicarbonato pH 8,2:

NaHCO ₃ (Synth)	0,1M;
NaCl (Synth)	0,1M.
<ul style="list-style-type: none"> • Albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem (Sigma); • Solução salina 0,9% estéril (Endogen); • Solução de Ringer-Locke (RL): 	
Cloreto de Potássio P.A.	9,00 g;
Cloreto de Potássio P.A.	0,42 g;
Cloreto de Cálcio P.A.	0,23 g;
Carbonato de Sódio P.A.....	0,15 g;
Glicose.....	0,99 g;
Água Destilada.....	1,00 L.

3.4 TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS PARA O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

<ul style="list-style-type: none"> • Tampão de bicarbonato pH 8,2: 	
NaHCO ₃ P.A. (Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....	0,1 M;
NaCl P.A.(Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....	0,1 M.
<ul style="list-style-type: none"> • Tampão Substrato pH 5,0: 	
Ácido Cítrico.....	34,7mM;
Na ₂ HPO ₄ .(Merck).....	66,7 Mm.
<ul style="list-style-type: none"> • Substrato: 	
OPD.....	0,4 mg;
H ₂ O ₂	0,4 µl;
Tampão substrato q.s.p.	1 mL.

- Tampão de lavagem PBS-tween 20, 0,1% v/v.

3.5. ANTICORPOS

- Concentrações de anticorpos e proteínas para ELISA:

citocina	Ac 1^{ario}	Ac 2^{ario}	Curva (11 pontos)
TNF- α	SB230499GR	SB54/450499/GR	4000pg/ml
IL-1 β	SB1002/260499	SB1002/280499	4000pg/ml

Todas as citocinas e antisoros foram gentilmente cedidas pelo Prof. Fernando de Queiróz Cunha do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.6. TAMPÕES E SOLUÇÕES USADOS NA DOSAGEM DA ATIVIDADE DE MIELOPROXIDASE

- Tampão fosfato de potássio: 988 mL solução A + 12 mL solução B

Solução A:

KH₂PO₄ (Synth) 6,8 g;
 Água destilada 1,0 L.

Solução B:

K₂HPO₄ (Synth) 8,7 g;
 Água destilada 1,0 L.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):

HTAB (Sigma) 5 g;

Tampão fosfato de potássio 1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%:

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec)1 mL;

Água destilada29 mL.

- Solução de o-dianisidina (DDI):

O-dianisidina (Sigma)16,7 mg;

Tampão fosfato de potássio10,0 mL;

H₂O₂50,0 µL;

Água destilada90,0 mL.

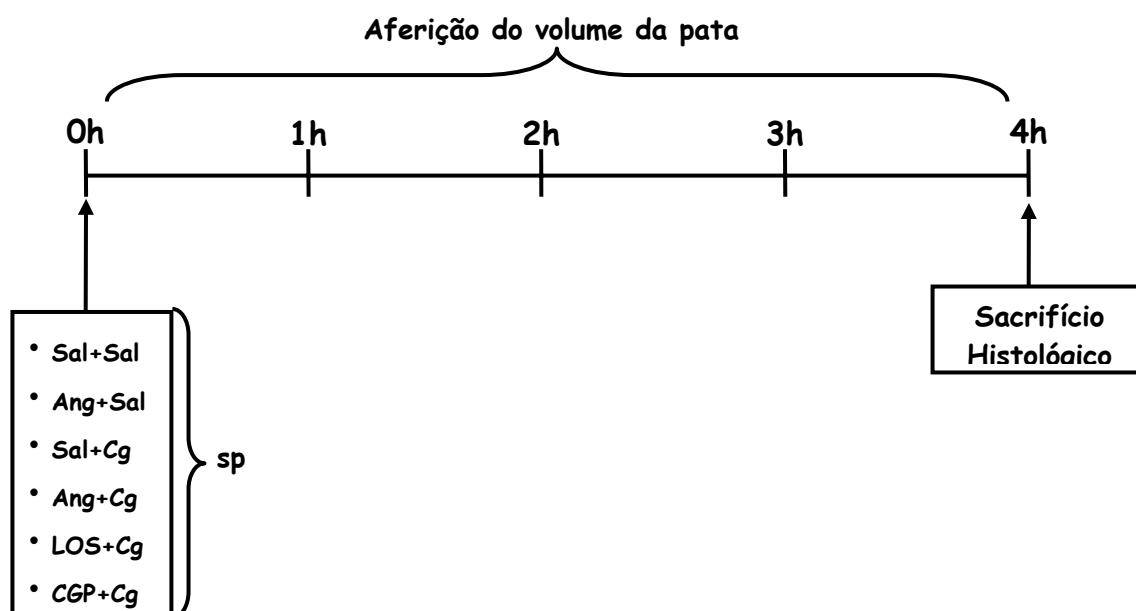
4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.1. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS

WISTAR

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, de acordo com a substância injetada na pata imediatamente antes da injeção sub-plantar (sp) de uma dose submáxima de Cg: Sal+Cg; A+Cg (Ang II na dose de 1 µg, sp); LOS+Cg (LOS na dose de 62,5 µg, sp) e CGP+Cg (CGP 42112A na dose de 142,5 µg, sp). Havia, ainda, os grupos A+Sal (Ang II na dose de 1 µg, sp) e Sal+Sal, que recebeu apenas injeções sp de Sal; ambos não receberam injeção do estímulo inflamatório (Cg). O volume da pata traseira esquerda dos animais foi aferido por pletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero), constituindo volume basal das patas. Imediatamente após as

primeiras injeções, os grupos Sal+Cg, A+Cg, CGP+Cg e LOS+Cg receberam injeção de Cg na dose de 100 µg. Todos os animais receberam duas injeções de 50 µL cada. Uma, 2, 3 e 4 horas após as injeções, o volume da pata foi novamente aferido. Para cada tempo, o volume do edema foi calculado como variação do volume da pata (volume no tempo determinado – volume no tempo zero). Após avaliação do edema, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi feita a coleta de pele e tecido celular subcutâneo da região subplantar para análise histológica. O Esquema 1 ilustra o delineamento experimental.

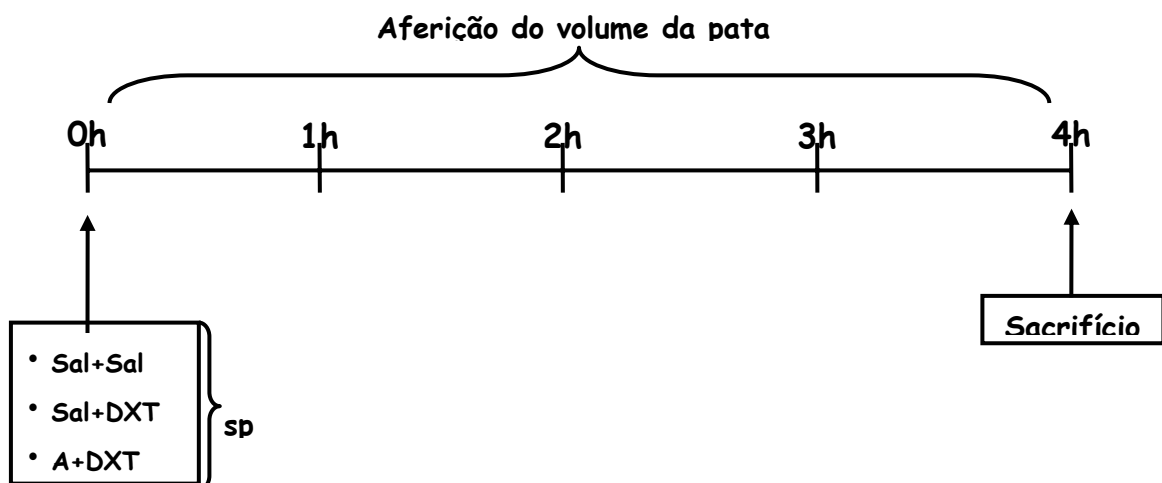


Esquema 1. Cronograma experimental do edema de pata induzido por Cg em ratos

4.2. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS *WISTAR*

Os animais foram divididos nos seguintes grupos, de acordo com a substância injetada na pata por via sp imediatamente antes da injeção do DXT: Sal+DXT; A+DXT (Ang II na dose de 1 µg) e LOS+DXT (LOS na dose de 62,5 µg, sp).

Havia, ainda, o grupo Sal+Sal, que não recebeu injeção de DXT, mas apenas de Sal. O volume da pata traseira esquerda dos animais foi aferido por pletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero), constituindo volume basal das patas. Imediatamente após as primeiras injeções, os grupos Sal+DXT, A+DXT e LOS+DXT receberam DXT na dose de 100 µg por via sp. O grupo Sal+Sal recebeu injeção de Sal. Todos os animais receberam duas injeções de 50 µL cada. O volume do edema foi aferido 1, 2, 3 e 4 horas após as injeções e foi calculado como a variação do volume da pata para cada espaço de tempo. O Esquema 2 mostra esse delineamento experimental.



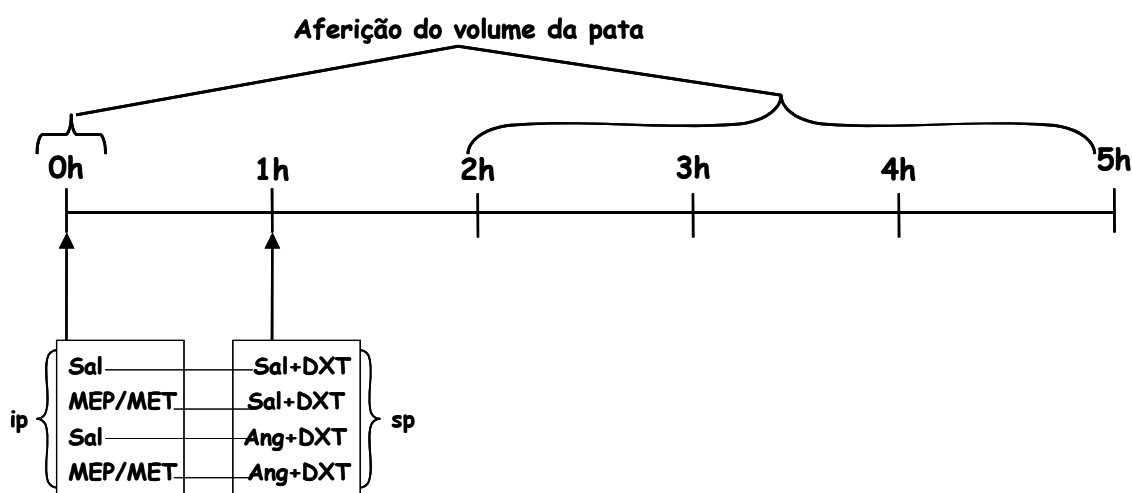
Esquema 2. Cronograma experimental do edema de pata induzido por DXT em ratos

4.3. INFLUÊNCIA DA MEPIRAMINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS *WISTAR*

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Sal/Sal+DXT; MEP/Sal+DXT; Sal/A+DXT; MEP/A+DXT. O volume da pata traseira esquerda dos animais foi aferido por pletismômetro (tempo zero), constituindo o volume

basal das patas. Os grupos MEP/Sal+DXT e MEP/A+DXT receberam injeção prévia de Mepiramina (10 mg/kg) por via ip. Os demais grupos receberam Sal também por via ip. Após 1 hora, os grupos Sal/Sal+DXT e MEP/Sal+DXT receberam injeções sp de Sal e de DXT (na dose de 100 µg). Os grupos Sal/A+DXT e MEP/A+DXT receberam Ang II (na dose de 1 µg) e DXT (na dose de 100 µg). O volume do edema foi aferido 1, 2, 3 e 4 horas após as injeções. O volume do edema para cada espaço de tempo foi calculado como variação do volume da pata. O Esquema 3 mostra o delineamento experimental.

Erro!



Esquema 3. Cronograma experimental da modulação por MEP ou MET do edema de pata induzido por DXT em ratos

4.4. INFLUÊNCIA DA METISERGIDA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN EM RATOS *Wistar*

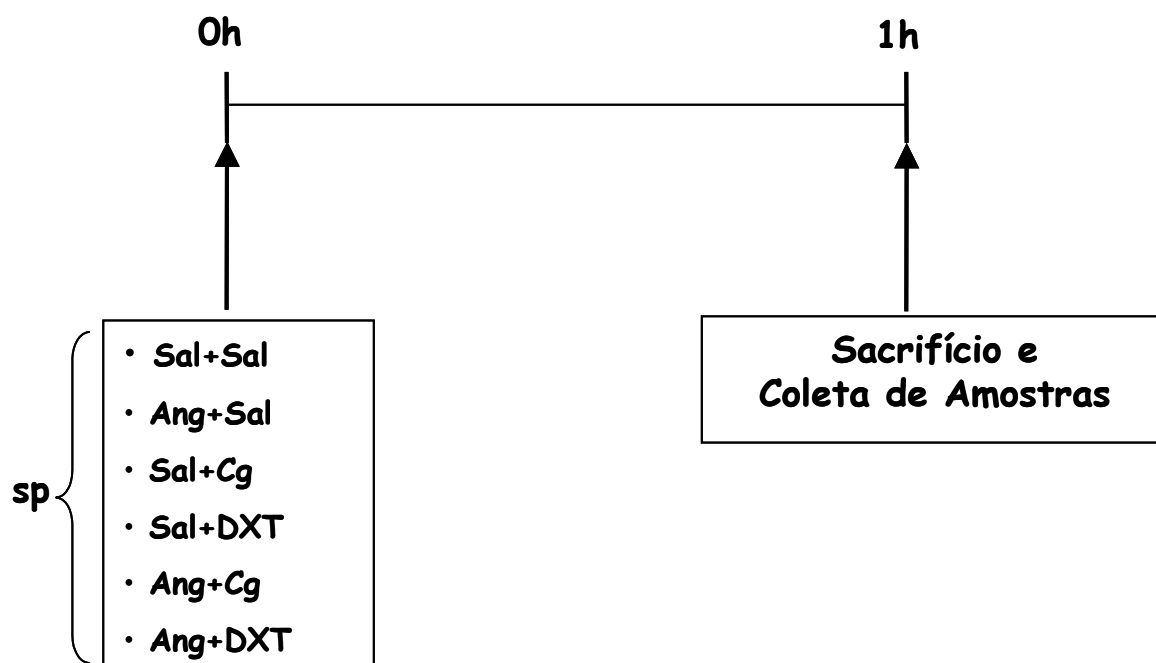
Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Sal/Sal+DXT; MET/Sal+DXT; Sal/A+DXT; MET/A+DXT. O volume da pata traseira esquerda dos animais foi aferido por pletismômetro (tempo zero), constituindo o volume

basal das patas. Os grupos MET/Sal+DXT e MET/A+DXT receberam injeção prévia de Metisergida (1mg/kg, ip). Os demais grupos receberam Sal também por via ip. Passada 1 hora, os grupos Sal/Sal+DXT e MET/Sal+DXT receberam injeções sp de Sal e de DXT (na dose de 100 µg). Os grupos Sal/A+DXT e MET/A+DXT receberam Ang II (na dose de 1 µg) e DXT (na dose de 100 µg). O volume do edema foi aferido 1, 2, 3 e 4 horas após as injeções. O volume do edema para cada espaço de tempo foi calculado como variação do volume da pata. O Esquema 3 mostra o delineamento experimental.

4.5. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA POR CARRAGENINA OU DEXTRAN NA PATA DE RATOS *WISTAR*

Ratos *Wistar* foram divididos nos seguintes grupos: Sal+Sal, A+Sal, Sal+Cg, Sal+DXT, A+Cg e A+DXT. Inicialmente foram aplicadas injeções sp de Ang II (dose de 1 µg) ou solução Sal e, logo em seguida, de Cg (na dose de 100 µg), DXT (na dose de 100 µg) ou Sal. Após 1h das injeções, foi feita a coleta de pele e tecido celular subcutâneo da região plantar para que fossem confeccionadas as lâminas, que foram coradas com azul de toluidina. Foram contadas 100 células em diferentes campos em MO, com aumento de 400X. A média do percentual de mastócitos degranulados foi calculada para cada grupo. O Esquema 4 mostra o delineamento experimental.

Erro!

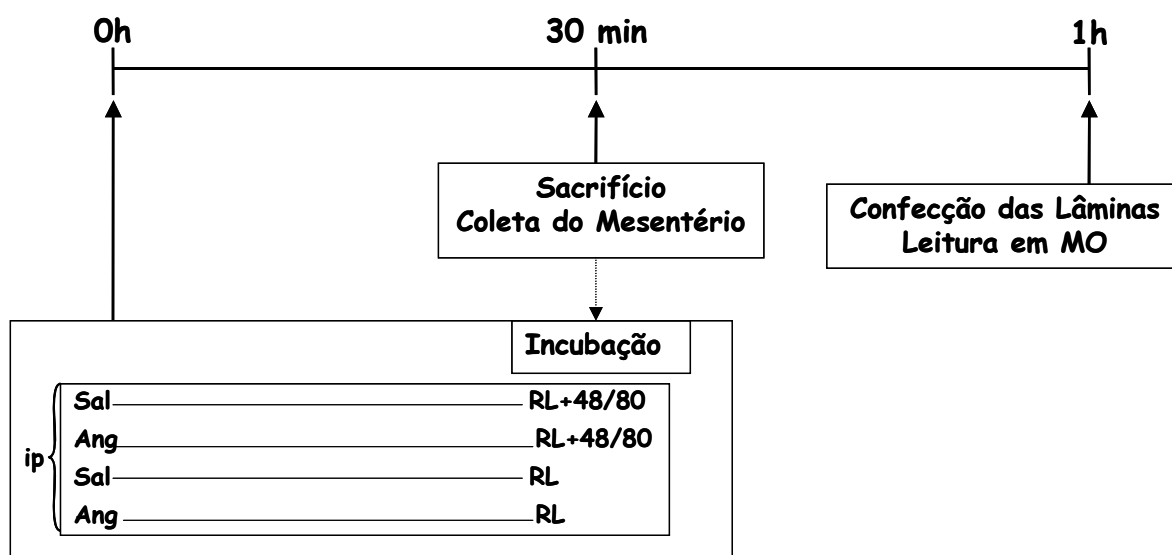


Esquema 4. Cronograma experimental da degranulação de mastócitos induzida por Cg ou DXT na pata de ratos

4.6. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 EM MESENTÉRIO DE RATOS *WISTAR*

Ratos *Wistar* foram divididos nos seguintes grupos: Sal+48/80; A+48/80; Sal+RL e A+RL. Os grupos A+48/80 e A+RL receberam injeção por via ip de 1 mL de Ang II (na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$); os demais grupos receberam 1 mL de Sal ip. Os animais foram sacrificados 30 minutos após as injeções por deslocamento cervical. Cortes do mesentério foram retirados e incubados por 30 minutos em solução de Ringer-Locke (RL) com ou sem o composto 48/80 (na concentração submáxima de 0,8 $\mu\text{g/mL}$), de acordo com o grupo. Durante o período de incubação, as peças permaneceram em placas de Petri a temperatura ambiente. Passados os 30 minutos, os tecidos foram retirados das placas e colocados sobre as lâminas. Após a secagem, todas as lâminas foram coradas com azul de toluidina por 2 minutos, lavadas com água

destilada e colocadas para secar. Em seguida, o excesso de gordura foi removido com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Foram contadas 100 células em diferentes campos com o auxílio de MO, utilizando-se aumento de 400X. Em seguida, calculou-se a média do percentual de mastócitos degranulados para cada grupo. O esquema 5 ilustra o delineamento experimental utilizado.



Esquema 5. Cronograma experimental da degranulação de mastócitos em mesentério de ratos

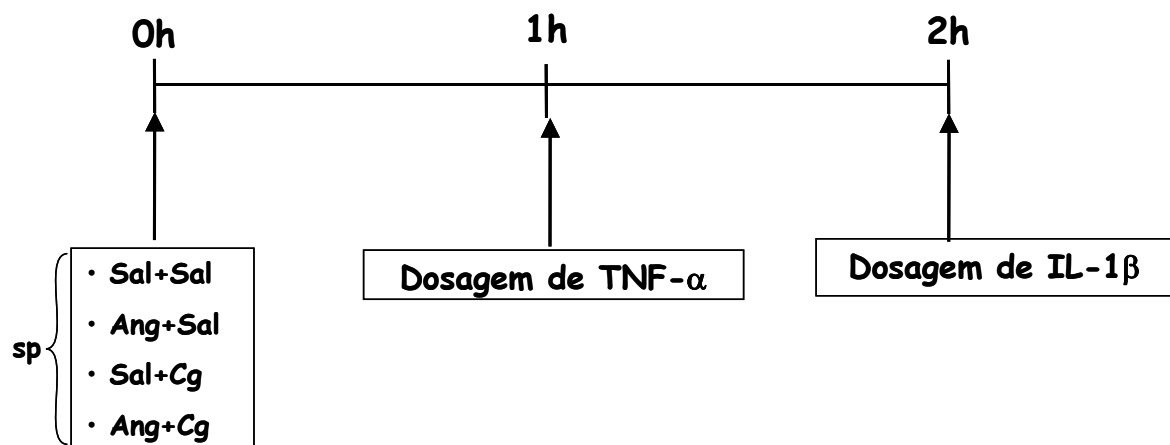
4.7. DOSAGEM DE TNF- α E IL-1 β NA PATA DE RATOS *WISTAR* POR ELISA

Ratos *Wistar* foram divididos nos seguintes grupos: Sal+Sal, Sal+Cg e A+Cg. Foram aplicadas injeções sp de Ang II (na dose de 1 μ g) ou Sal e, logo em seguida, de Cg (na dose de 100 μ g) ou Sal. Após 1h das injeções, os animais foram sacrificados e foram colhidas amostras de pele e tecido celular subcutâneo da região sp para posterior dosagem de TNF- α . Para a dosagem de IL-1 β , as amostras foram colhidas após 2h das injeções, de acordo com a

cinética de produção destas citocinas proposta por CUNHA e cols (2000). As amostras colhidas foram estocadas a -70°C e enviadas ao laboratório do Prof. Fernando Cunha em Ribeirão Preto para que fosse feita a dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ pelo método de ELISA, utilizando o protocolo descrito a seguir:

- Suspensão das amostras em tampão inibidor de protease (500 μL de tampão para cada 100 mg de tecido) e processamento com um homogeneizador de tecidos;
- Centrifugação a 3000 rpm a 4°C por 10 min e retirada do sobrenadante;
- Incubação com 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2) - 100 $\mu\text{l/poço}$ (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C ;
- Lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v;
- Bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l/poço}$ por 2h à temperatura ambiente;
- Lavagem da placa (3x);
- Incubação com a curva padrão das citocinas diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 $\mu\text{l/poço}$ por 16-24h à 4°C);
- Lavagem da placa (3x);
- Incubação com anticorpo biotilado diluído a 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente;
- Lavagem da placa (3x);
- Incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 $\mu\text{l/poço}$ por 15 min à temperatura ambiente;

- Lavagem da placa (3x);
- Incubação com o-fenilenediamina diidroclorato (OPD) em tampão substrato, 100 µl/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente;
- A reação foi parada com 150 µl/poço de H₂SO₄ 1M;
- A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm;
- Os resultados são expressos como média ± EPM da quantidade de TNF- α ou IL-1 β , em pg/ml, para 4-6 amostras por tratamento. O esquema 6 mostra este delineamento experimental.

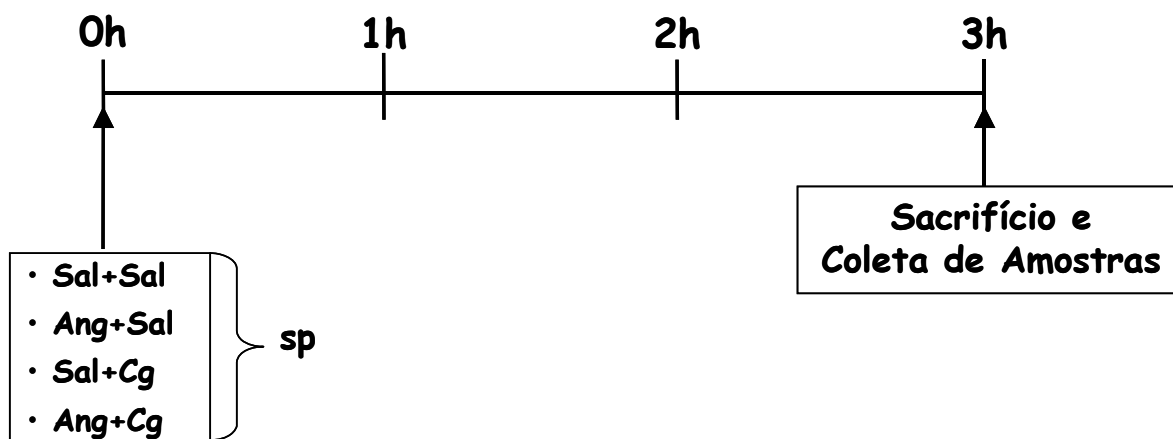


Esquema 6. Cronograma experimental utilizado para coleta de amostras para dosagem de citocinas

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NA PATA DE RATOS *WISTAR*

Ratos *Wistar* foram divididos nos seguintes grupos: Sal+Sal, Sal+Cg e A+Cg. Foram aplicadas injeções sp de Ang II (na dose de 1µg) ou Sal e, logo em seguida, de Cg (na dose de 100µg) ou Sal. Após 3h das injeções, tempo correspondente ao pico do edema da Cg, os animais foram sacrificados e

foram colhidas amostras de pele e tecido celular subcutâneo da região sp, que foram estocadas a -70°C, para posterior dosagem da atividade de MPO no tecido. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos PMN e tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6.0; 50 mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente, foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por BRADLEY e cols (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para a MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C. No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/5mg de tecido. O delineamento experimental está mostrado no esquema 7.



Esquema 7. Cronograma experimental utilizado para coleta de amostras para dosagem da atividade de MPO tecidual

4.9. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS *WISTAR*

Os animais foram divididos nos grupos: Sal+Sal, Sal+Cg, A+Cg e A+Sal. Os animais dos grupos A+Cg e A+Sal receberam injeção prévia de 0,5 mL de Ang II na dose de 0,5 µg por via intraperitoneal (ip). Os demais grupos receberam 0,5 mL de Sal. Após 1 hora, todos os grupos receberam 0,5 mL de uma dose submáxima de Cg (100 µg, ip), com exceção dos grupos Sal+Sal e A+Sal, que receberam apenas Sal. Os animais foram sacrificados 4 horas após a injeção de Cg ou Sal.

Em seguida, a cavidade peritoneal foi lavada com 7 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para a coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens total e diferencial foram feitas de acordo com método descrito por SOUZA & FERREIRA (1985).

Do líquido colhido, 20 µl foram diluídos em 380 µl de líquido de Turk (diluição de 1:20) e utilizados para a contagem total de células em câmara de Neubauer.

Para a contagem diferencial de células, 30 µL do exudato foram colocados em citocentrífuga (10 min a 2800 rpm). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA 3. A leitura foi realizada em MO, com objetiva de imersão (aumento de 100X). Foram contadas 100 células em cada orifício (200 células por lâmina). O número total de neutrófilos foi estimado calculando-se as percentagens do número total de células encontradas. O Esquema 8 traz o cronograma do experimento.



Esquema 8. Cronograma do experimento de migração de PMN induzida por Cg para a cavidade peritoneal em ratos.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg) EM RATOS *WISTAR*

A Cg (100 μ g, sp – grupo Sal+Cg) promoveu um aumento significativo do volume da pata dos animais em comparação com o grupo Sal+Sal; esse aumento foi significativo a partir da segunda hora, apresentando pico na terceira hora. A injeção sp de Ang II (1 μ g) potenciou o aumento do volume da pata induzido pela Cg. Essa potenciação foi significativa já na primeira hora ($p < 0,05$). No entanto, no grupo A+Sal, a Ang II não foi capaz de, por si só, induzir alteração do volume da pata (**Figuras 1 e 2**).

2. EFEITO DO ANTAGONISTA DE AT1 (LOSARTAN-LOS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg) EM RATOS *WISTAR*

A injeção de LOS (62,5 μ g, sp) amplificou de forma significativa o edema de pata induzido pela Cg (100 μ g, sp) sendo esse aumento significativo já na primeira hora ($p < 0,05$) e com pico na terceira hora (**Figura 3**).

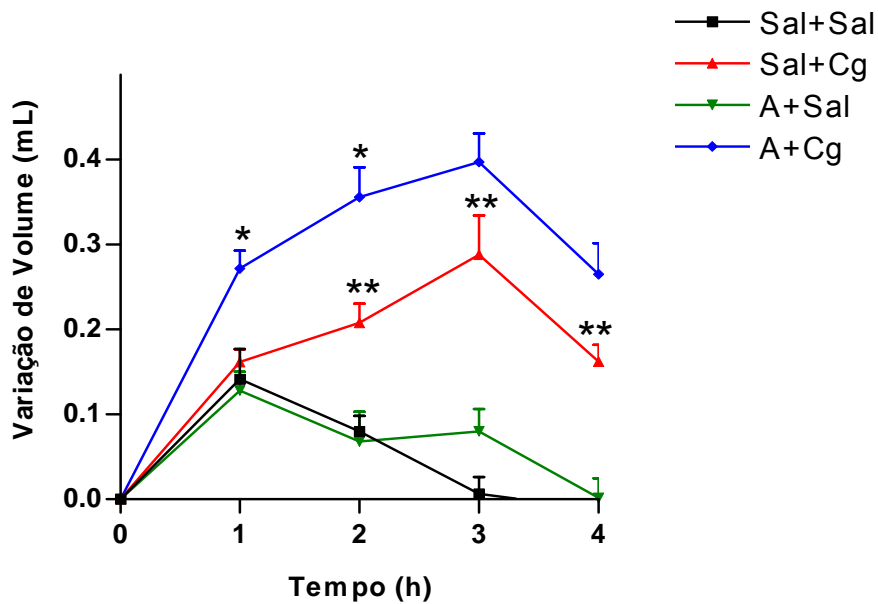
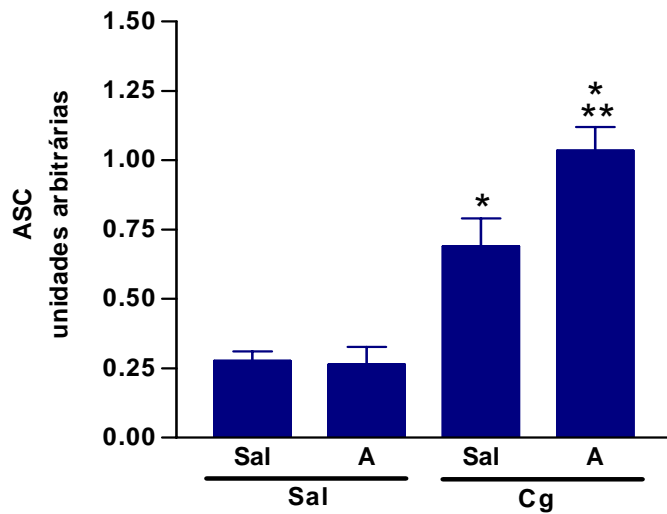
A**B**

Figura 1. Efeito da angiotensina II sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Ang II ($1\mu\text{g}$, sp) ou Salina (Sal) foi injetada imediatamente antes da indução do edema com Cg ($100\mu\text{g}$, sp) ou da injeção de Sal. O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de Cg ou Sal **A**: Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B**: As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal + Sal e (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal + Cg. ANOVA/Bonferroni.

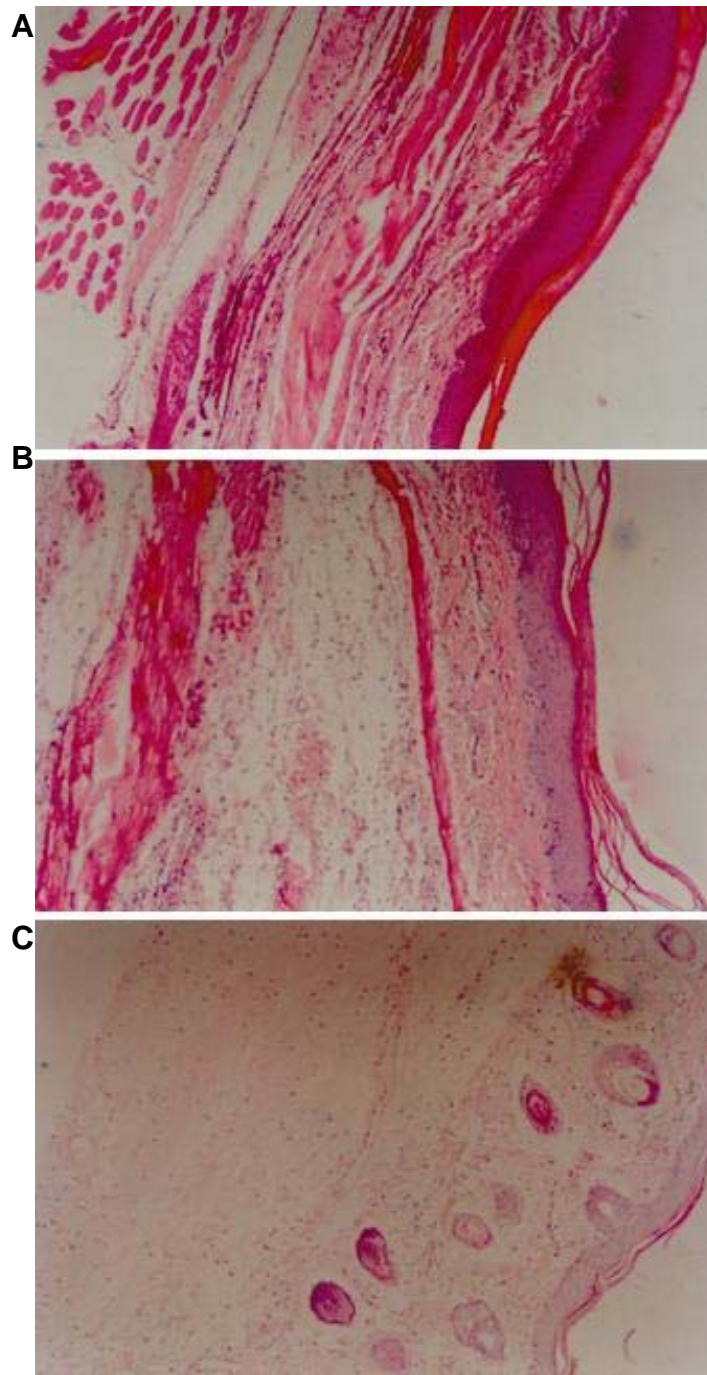
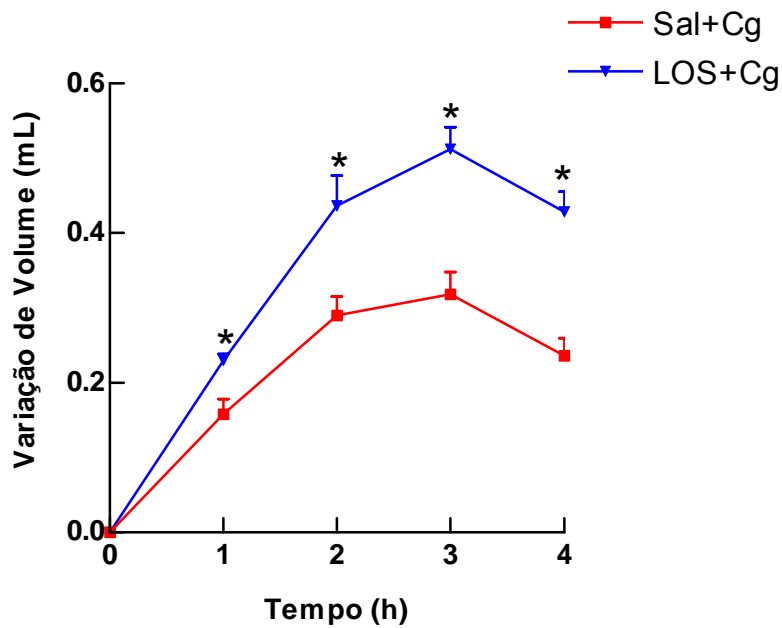


Figura 2. Efeito da angiotensina II sobre infiltrado celular inflamatório e edema intersticial em ratos tratados com carragenina subplantar. Estão representadas fotomicrografias (aumento de 100x) de cortes histológicos corados pelo método de H&E da região plantar das patas traseiras injetadas com sal (**A**), sal+Cg (**B**) ou Ang II+Cg (**C**). Quatro horas após a injeção de Cg, observa-se que a Ang II aumenta o edema intersticial sem, no entanto, alterar o infiltrado celular inflamatório em relação aos animais que não receberam injeção de Ang II.

A



B

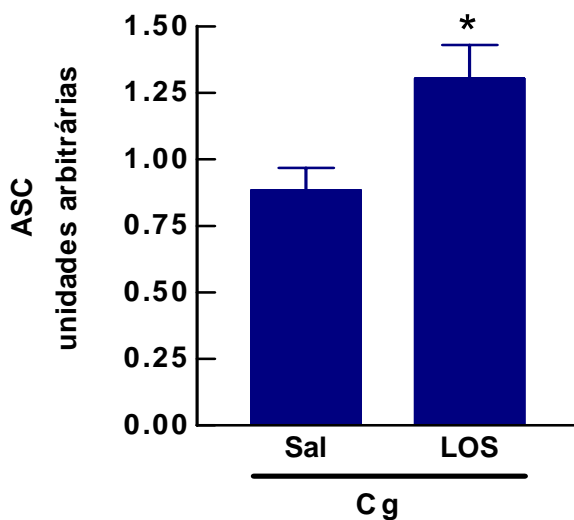


Figura 3. Efeito do antagonista de AT1 (Losartan) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratos. LOS (62,5 μ g, sp) ou Salina (Sal) foi injetado imediatamente antes da indução do edema com Cg (100 μ g, sp). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de Cg. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) p <0,05 em relação ao grupo Sal+Cg. Teste t.

3. EFEITO DO AGONISTA DE AT2 (CGP 42112A) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg) EM RATOS *Wistar*

A administração de CGP (142,5µg, sp) potenciou de forma significativa ($p < 0,05$) o edema de pata induzido pela Cg (100µg, sp). Essa amplificação foi significativa já nas primeiras horas (**Figura 4**).

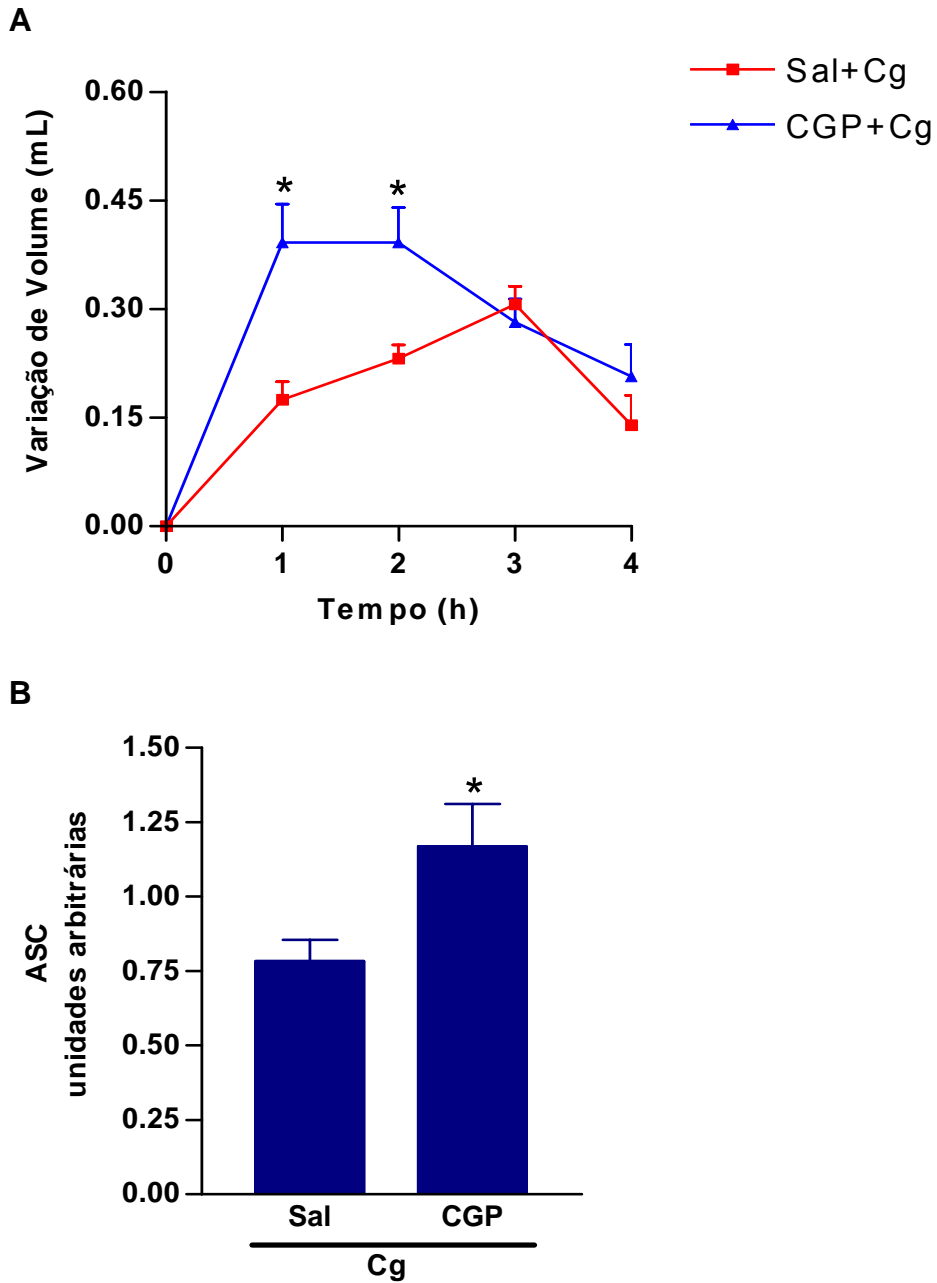


Figura 4. Efeito do agonista de AT₂ (CGP-42112A) sobre o volume do edema de pata induzido por carragenina em ratos. CGP-42112A (142,5µg, sp) ou Salina (Sal) foi injetado imediatamente antes da indução do edema com Cg (100µg, sp). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de Cg. **A:** Os pontos das curvas representam a média ± EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*)p<0,05 em relação ao grupo Sal+CG. Teste t.

4. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS *WISTAR*

A administração sp de DXT (100 μ g) induziu aumento significativo do volume da pata dos animais nas primeiras horas. A injeção sp de Ang II (1 μ g) amplificou o edema de pata promovido pelo DXT, sendo esta amplificação significativa ($p < 0,05$) na primeira e segunda horas (**Figura 5**).

5. EFEITO DO ANTAGONISTA DE AT1 (LOSARTAN-LOS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS *WISTAR*

A injeção de LOS (62,5 μ g, sp) amplificou o edema de pata induzido pelo DXT (100 μ g, sp) de forma significativa desde a primeira hora, com pico já na segunda hora ($p < 0,05$) (**Figura 6**).

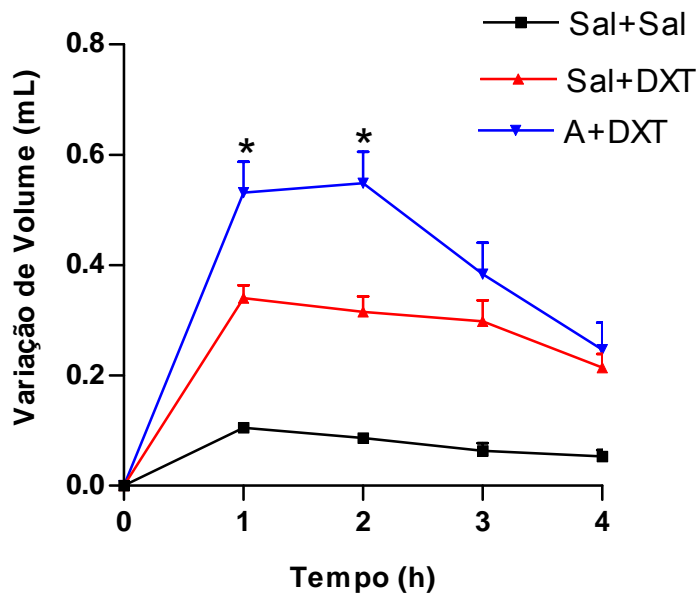
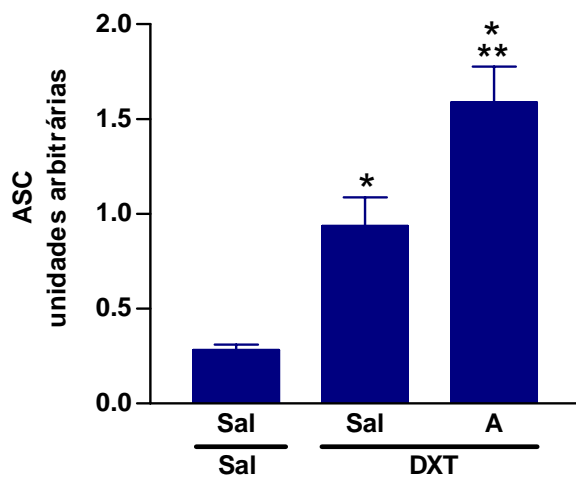
A**B**

Figura 5. Efeito da angiotensina II sobre o volume do edema de pata induzido por dextran em ratos. Ang II (1 μ g, sp) ou Salina (Sal) foi injetada imediatamente antes da indução do edema com DXT (100 μ g, sp) ou da injeção de Sal. O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de DXT ou Sal. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal + Sal. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+DXT. ANOVA/Bonferroni.

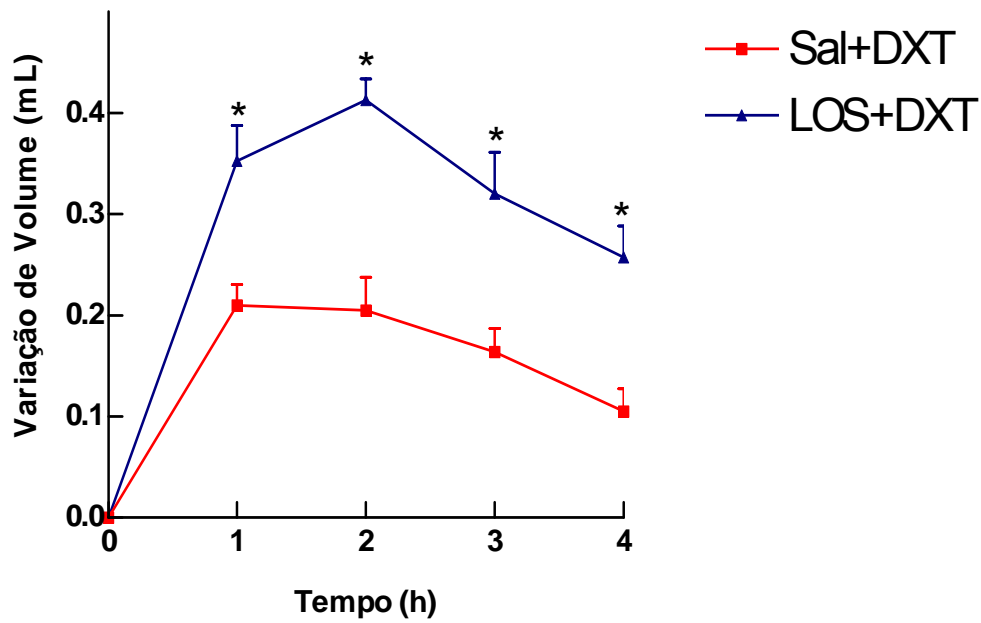
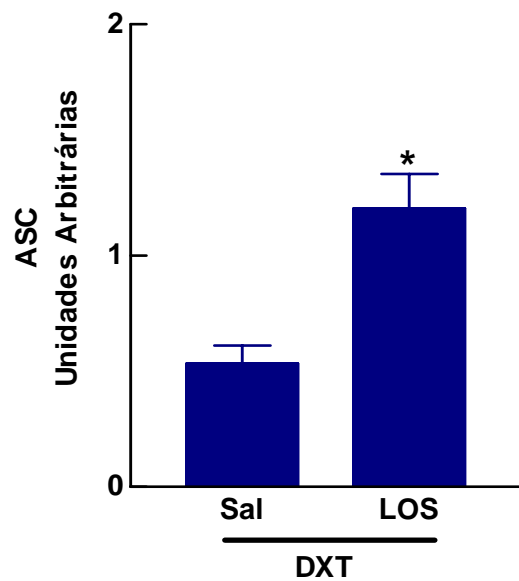
A**B**

Figura 6. Efeito do antagonista de AT1 (Losartan) sobre o volume do edema de pata induzido por dextran em ratos. LOS (62,5 μ g, sp) ou Salina (Sal) foi injetado imediatamente antes da indução do edema com DXT (100 μ g, sp). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de DXT. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+DXT. Teste t.

6. EFEITO DO ANTI-HISTAMÍNICO MEPIRAMINA (MEP) SOBRE A MODULAÇÃO POR ANGIOTENSINA II (Ang II) DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS *WISTAR*

A injeção de MEP (10mg/kg, ip) uma hora antes da administração sp de DXT (100µg) e de Ang II (1µg) reduziu de forma significativa o edema do DXT ($p < 0,05$), bem como a potenciação deste pela Ang II ($p < 0,05$); isso ocorreu entre a 2^a e a 4^a hora (**Figura 7**).

7. EFEITO DO ANTI-SEROTONÍNÉRGICO METISERGIDA (MET) SOBRE A MODULAÇÃO POR ANGIOTENSINA II (Ang II) DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DEXTRAN (DXT) EM RATOS *WISTAR*

A injeção de MET (1mg/kg, ip) uma hora antes da administração sp de DXT (100µg) e de Ang II (1µg) reduziu o edema do DXT ($p < 0,05$), bem como a potenciação deste pela Ang II de forma bastante significativa ($p < 0,05$) durante a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a hora (**Figura 8**).

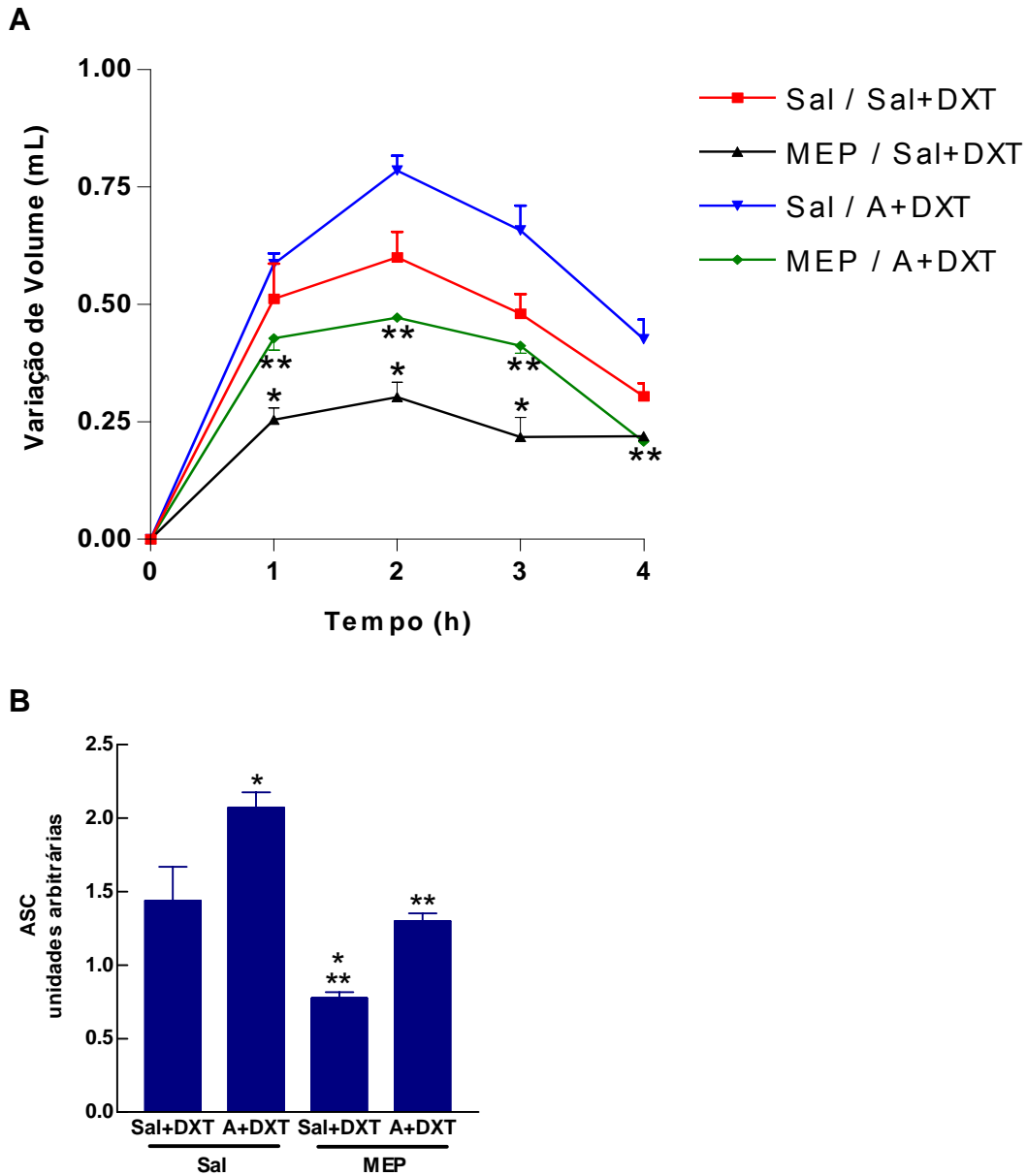


Figura 7. Efeito do anti-histamínico mepiramina sobre a modulação por angiotensina II do edema de pata induzido por dextran em ratos. Os animais receberam pré-tratamento com MEP (10mg/kg, ip) ou Salina (Sal); Após 1 hora, Ang II (1 μ g, sp) ou Sal foi injetada imediatamente antes da indução do edema com DXT (100 μ g, sp). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de DXT. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal/Sal + DXT. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal/A+DXT. ANOVA/Bonferroni.

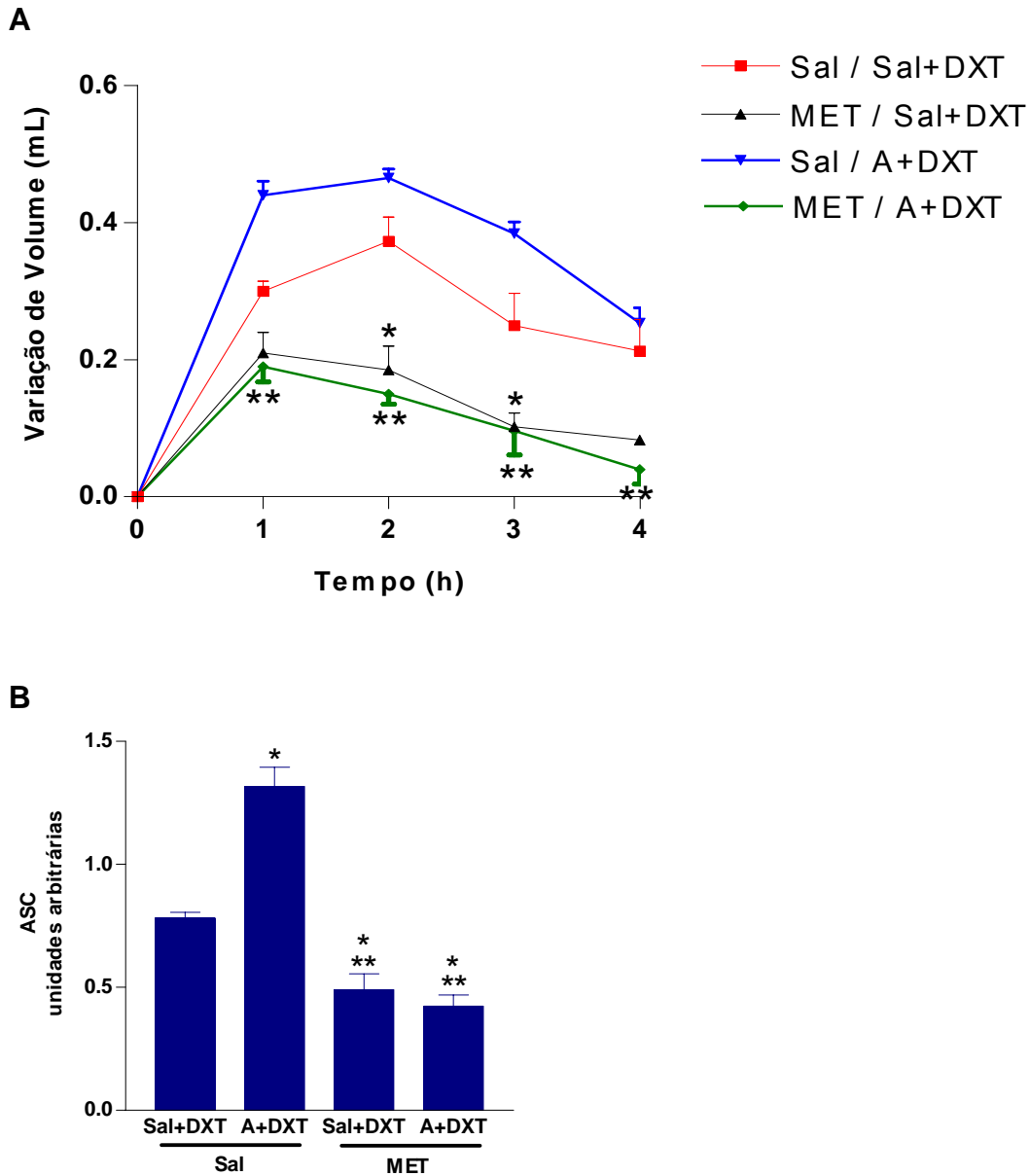


Figura 8. Efeito do anti-serotoninérgico metisergida sobre a modulação por angiotensina II do edema de pata induzido por dextran em ratos. Os animais receberam pré-tratamento com MET (1mg/kg, ip) ou Salina (Sal); Após 1 hora, Ang II (1 μ g, sp) ou Sal foi injetada imediatamente antes da indução do edema com DXT (100 μ g, sp). O volume do edema de pata foi aferido 1, 2, 3 e 4h após a injeção de DXT. **A:** Os pontos das curvas representam a média \pm EPM da variação do volume da pata de 5-6 animais por tratamento. **B:** As colunas representam a área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal/Sal+DXT. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal/A+DXT. ANOVA/Bonferroni.

8. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NA PATA DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM CARRAGENINA (Cg)

A Cg (100µg, sp – grupo Sal+Cg) promoveu significativo aumento da degranulação de mastócitos quando comparado ao grupo Sal+Sal ($p<0,05$). A injeção sp de Ang II (1µg – grupo A+Cg) potenciou significativamente ($p<0,05$) o aumento na percentagem de degranulação de mastócitos produzido pela administração sp de Cg na pata de ratos *Wistar*. No grupo A+Sal, onde se administrou apenas Ang II, na ausência de Cg, houve também significativo ($p<0,05$) aumento da degranulação de mastócitos quando comparado ao grupo Sal+Sal (**Figuras 9 e 10**).

9. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (ANG II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NA PATA DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM DEXTRAN (DXT)

A administração de Ang II (1µg – grupo A+DXT) por via sp potenciou de forma significativa ($p<0,05$) o aumento do índice de degranulação de mastócitos produzido pela injeção de DXT (100µg, sp – grupo Sal+DXT) na pata de ratos *Wistar* (**Figura 9**).

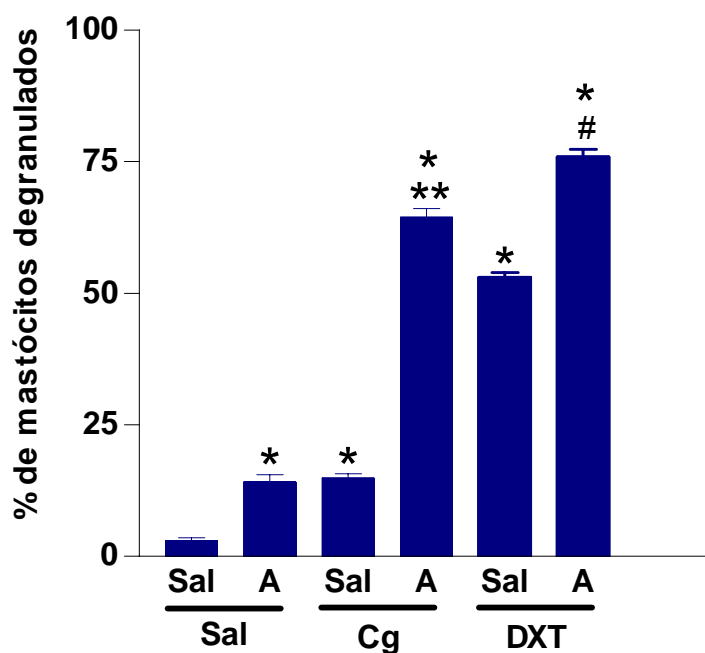


Figura 9. Efeito da angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos induzida por carragenina ou por dextran na pata de ratos . Ang II (1 μ g, sp) ou Salina (Sal) foi injetada imediatamente antes da indução do edema com Cg (100 μ g, sp) ou DXT (100 μ g, sp), ou da injeção de Sal. Após 1 hora, os animais foram sacrificados e foram colhidas amostras da pele e tecido subcutâneo para a confecção de lâminas que foram coradas com azul de toluidina. Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem de mastócitos degranulados obtidos por contagem, em microscópio óptico, de 100 células em diferentes campos com aumento de 400X. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal. (**) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Cg. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+DXT. ANOVA/Bonferroni.

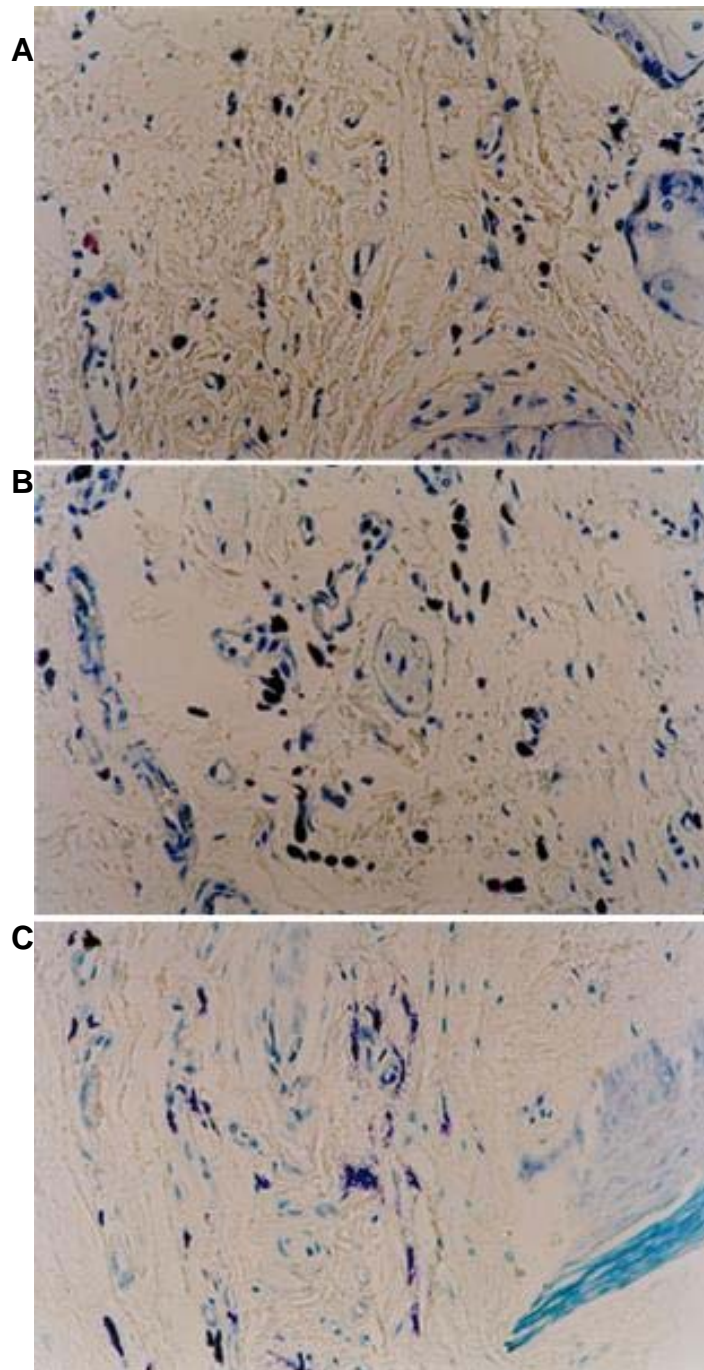


Figura 10. Efeito da angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos na pata de ratos tratados com carragenina subplantar. Estão representadas fotomicrografias (aumento de 400x) de cortes histológicos corados com azul de toluidina da pata de ratos que receberam Sal (A), Sal+Cg(B) ou Ang II+Cg (C) sp. Observa-se claramente uma grande quantidade de mastócitos degranulados pela Ang II (C) em relação aos animais que não receberam Ang II (A e B).

10. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA PELO COMPOSTO 48/80 EM MESENTÉRIO DE RATOS *WISTAR*

A injeção ip de Ang II (1 μ g) aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 (0,8 μ g/mL) em mesentério de ratos *Wistar* (grupo A+48/80). Além disso, no grupo A+RL, onde Ang II foi administrada de forma ip, mas a amostra de mesentério colhida após o sacrifício não foi incubada com o composto 48/80, também houve significativa ($p < 0,05$) degranulação de mastócitos, semelhante àquela do grupo A+48/80. **(Figuras 11 e 12).**

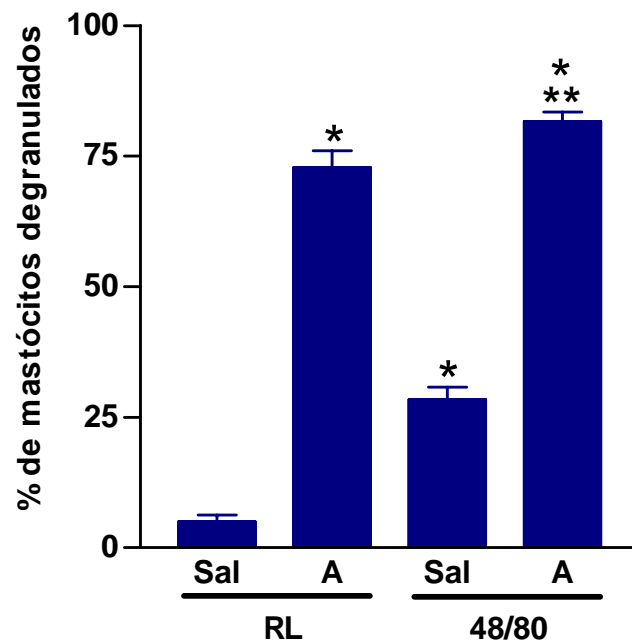


Figura 11. Efeito da angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos em mesentério de ratos induzida pelo composto 48/80. Os animais receberam injeção de Ang II (1 μ g, ip) ou de Salina (Sal). Após 30 min, os animais foram sacrificados e foram removidas amostras do mesentério, que foram incubadas por 30 min em solução nutritiva de Ringer-Looke (RL). Nos grupos Sal+48/80 e A+48/80, acrescentou-se o composto 48/80 (0,8 μ g/ml) à solução nutritiva. Os valores representam a média \pm EPM da porcentagem de mastócitos degranulados obtidas por contagem, em microscópio óptico, de 100 células em diferentes campos com aumento de 400X. (*)p<0,05 em relação ao grupo Sal+RL. (**)p<0,05 em relação ao grupo Sal+48/80. ANOVA/Bonferroni.

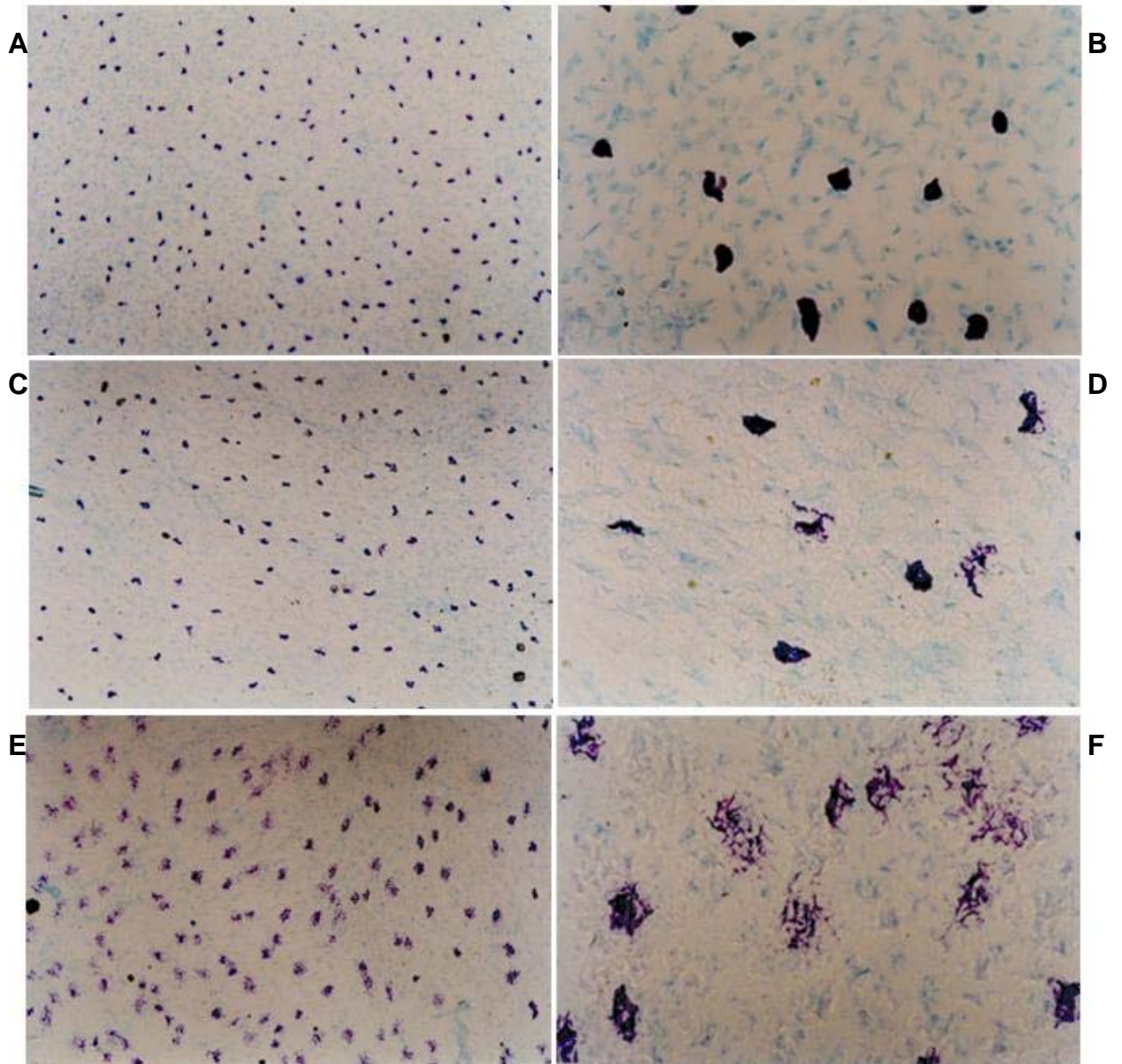


Figura 12. Efeito da angiotensina II sobre a degranulação de mastócitos em mesentério de ratos incubados com composto 48/80. Estão representadas fotomicrografias (aumentos de 100 e 400x) de cortes histológicos corados com azul de toluidina de mesentérios incubados em solução de RL com (C, D E e F) ou sem (A e B) composto 48/80 em ratos que receberam Sal (A, B, C e D) ou Ang II (E e F) ip. Observa-se claramente uma grande quantidade de mastócitos degranulados pela Ang II (E e F) em relação aos animais que não receberam Ang II (A, B, C e D).

11. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE O AUMENTO DA DOSAGEM DE TNF- α NA PATA DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM CARRAGENINA (Cg)

A injeção sp de Cg (100 μ g – grupo Sal+Cg) na pata de ratos *Wistar* induziu aumento significativo da dosagem de TNF- α ($p < 0,05$). No entanto, a injeção sp de Ang II (1 μ g – grupo A+Cg) não foi capaz de alterar o aumento da dosagem de TNF- α promovido pela administração de Cg (**Figura 13**).

12. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE O AUMENTO DA DOSAGEM DE IL-1 β NA PATA DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM CARRAGENINA (Cg)

A injeção sp de Cg (100 μ g – grupo Sal+Cg) na pata de ratos *Wistar* induziu aumento significativo da dosagem de IL-1 β ($p < 0,05$). Porém, a injeção sp de Ang II (1 μ g – grupo A+Cg) não foi capaz de alterar o aumento da dosagem de IL-1 β promovido pela administração de Cg (**Figura 14**).

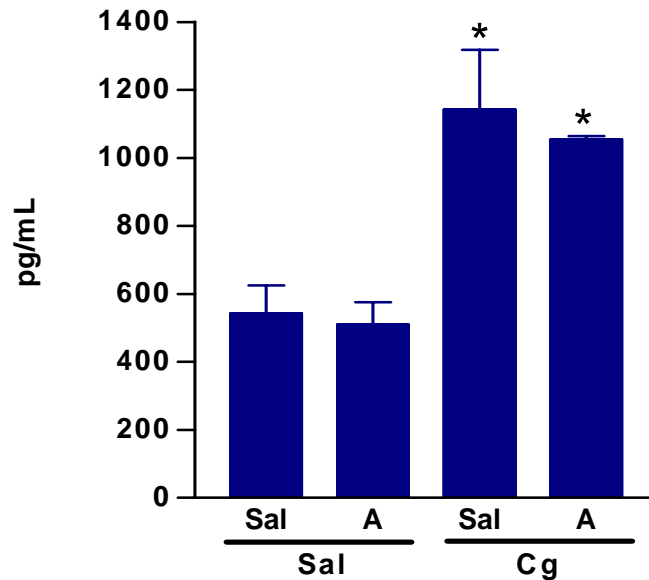


Figura 13. Efeito da angiotensina II sobre a dosagem de TNF- α na pata de ratos tratados com carragenina ou salina subplantar. Ang II ($1\mu\text{g}$, sp) ou Sal foi injetada imediatamente antes da indução do edema com Cg ($100\mu\text{g}$, sp) ou da injeção de Sal. Após duas horas, foram retiradas amostras de pele e tecido celular subcutâneo da região plantar. O conteúdo de TNF- α presente em cada amostra foi determinado por ELISA. As colunas representam a média \pm EPM da quantidade de TNF- α das amostras de 5 animais por tratamento. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal. ANOVA/Bonferroni.

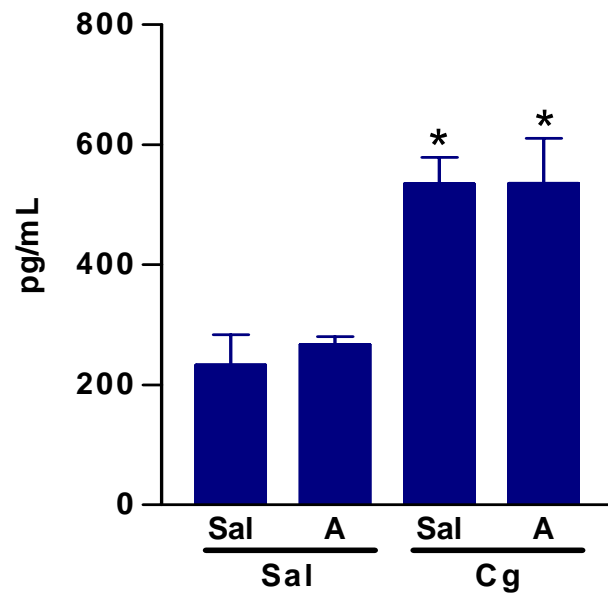


Figura 14. Efeito da angiotensina II sobre a dosagem de IL-1 β na pata de ratos tratados com carragenina ou salina subplantar. Ang II (1 μ g, sp) ou Sal foi injetada imediatamente antes da indução do edema com Cg (100 μ g, sp) ou da injeção de Sal. Após duas horas, foram retiradas amostras de pele e tecido celular subcutâneo da região plantar. O conteúdo de IL-1 β presente em cada amostra foi determinado por ELISA. As colunas representam a média \pm EPM da quantidade de IL-1 β das amostras de 5 animais por tratamento. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal. ANOVA/Bonferroni.

13. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE A DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO) NA PATA DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM CARRAGENINA (Cg)

A administração de Cg (100 μ g, sp – grupo Sal+Cg) promoveu um aumento significativo ($p < 0,055$) da dosagem de MPO presente no tecido subcutâneo retirado da pata dos animais quando comparado ao grupo Sal+Sal; esse aumento foi significativo no primeiro, no terceiro e no quinto minuto de reação durante a leitura em espectrofotômetro. No grupo A+Cg, a administração prévia Ang II (1 μ g, sp) não promoveu alteração significativa na dosagem de MPO em relação àquela produzida pela Cg. A Ang II (grupo A+Sal) não foi capaz de produzir aumento da dosagem de MPO na ausência de Cg (**Figura 15**).

14. EFEITO DA ANGIOTENSINA II (Ang II) SOBRE A MIGRAÇÃO DE POLIMORFONUCLEARES (PMN) PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM CARRAGENINA (Cg)

A injeção ip de Cg (0,5 μ g – grupo Sal+Cg) induziu aumento significativo ($p < 0,0505$) da migração de PMN para a cavidade peritoneal dos animais em relação ao grupo Sal+Sal. A administração prévia de Ang II (0,5 μ g, ip – grupo A+Cg) não promoveu potenciação da migração de PMN promovida pela Cg. Na ausência de Cg, a Ang II (0,5 μ g, ip – grupo A+Sal) não alterou o grau de migração de PMN quando comparado ao grupo Sal+Sal (**Figura 16**).

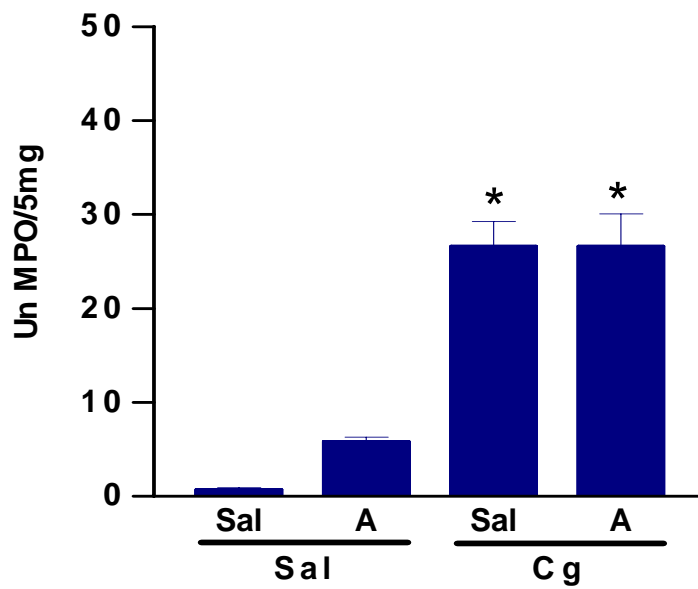


Figura 15. Efeito da angiotensina II sobre a dosagem de mieloperoxidase na pata de ratos tratados com carragenina ou salina subplantar. Ang II (1 μ g, sp) ou Sal foi injetada imediatamente antes da indução do edema com Cg (100 μ g, sp) ou da injeção de Sal. Após duas horas, foram retiradas amostras de pele e tecido subcutâneo da região plantar. O conteúdo de MPO presente em cada amostra foi determinado por método enzimático colorimétrico. As colunas representam a média \pm EPM de unidades de MPO/ 5mg de tecido das amostras de 5 animais por tratamento, considerando-se o 3^o min do ensaio. (*) p <0,05 em relação ao grupo Sal+Sal. ANOVA/Bonferroni.

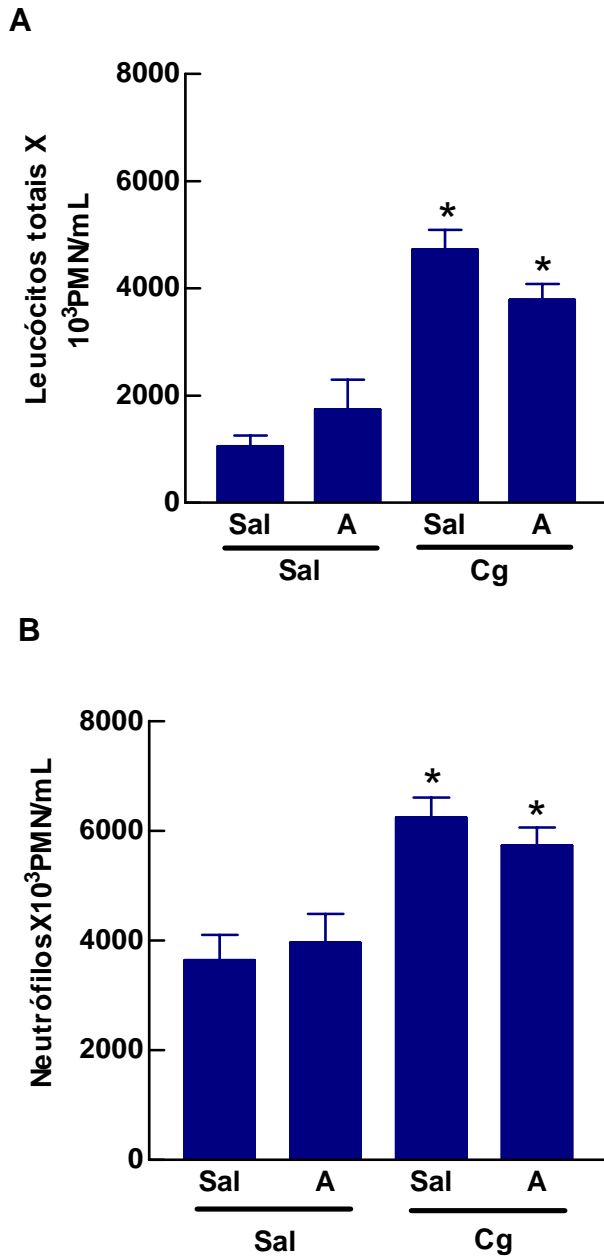


Figura 16. Efeito da angiotensina II sobre a migração de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em ratos. Inicialmente injetou-se Ang II (0,5 μ g, ip) ou Salina (Sal) e, logo em seguida, injetou-se Cg (100 μ g, ip) ou Sal. Contagens total (A) e diferencial (B) de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal foram realizadas após 4h, quando ocorreu o sacrifício dos animais. As barras representam a média \pm EPM do número de leucócitos totais ou PMN que migraram em 5-6 animais por tratamento. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo Sal+Sal. ANOVA/Bonferroni.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Trabalhos da literatura vêm demonstrando que a Ang II, além de seus bem conhecidos efeitos no sistema cardiovascular, participa da patogênese de várias doenças nas quais a resposta inflamatória está envolvida tais como aterosclerose (WU *et al.*, 2001), artrite reumatóide (MARTIN *et al.*, 1984), doença de Chron (JASZEWSKI *et al.*, 1990) e reação pós-infarto do miocárdio (KLETT *et al.*, 1993; SCHIEFFER *et al.*, 1994). No presente trabalho demonstrou-se que a Ang II potenciou o edema de pata induzido por uma dose submáxima de Cg. A Ang II, no entanto, falhou em promover inflamação na ausência da Cg, mostrando, assim, que necessita da presença de mecanismos desencadeadores para iniciar sua ação pró-inflamatória. A coadministração de Ang II e Cg potenciou o efeito desta em promover inflamação. É importante ressaltar que a dose de Cg utilizada por nós para indução do edema de pata foi uma dose menor do que aquela responsável pelo edema clássico da Cg (DI ROSA *et al.*, 1971). O fato de termos trabalhado com uma dose submáxima de Cg foi importante, já que queríamos analisar o efeito potenciador de algumas substâncias, como Ang II, LOS e CGP-42112A. Outros autores também já utilizaram tal recurso (BOURA & SVOLMANIS, 1984; BLAIS *et al.*, 1999; RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000).

O efeito pró-inflamatório da Ang II já foi relatado em outros estudos (KLETT *et al.*, 1993; SCHIEFFER *et al.*, 1994; RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000). A concentração plasmática do angiotensinogênio aumenta durante várias formas de inflamação aguda. Além disso, macrófagos presentes em granulomas de ratos liberam ECA, promovendo aumento da formação de Ang

II, que, por sua vez, modula a atividade de monócitos/macrófagos, amplificando, assim, a resposta inflamatória (SIMON *et al.*, 1991; KLETT *et al.*, 1993). Segundo WALSH e cols (1997) os receptores AT1 e AT2 da Ang II, bem como a ECA, desenvolvem-se seqüencialmente durante a angiogênese no granuloma esponjoso em ratos, indicando a expressão de componentes do SRA no sítio da inflamação.

SCHIEFFER e cols (1994) compararam os efeitos cardíacos da inibição crônica da ECA e do bloqueio de receptores AT1 da Ang II em modelo de infarto do miocárdio em ratos. Os autores demonstraram que ambas as terapias reduziram a hipertrofia cardíaca pós-infarto, sugerindo a participação da Ang II no processo inflamatório decorrente de um infarto de miocárdio.

O LOS, droga antagonista dos receptores AT1 da Ang II, também potencializou o edema de pata induzido pela Cg. Estes dados estão de acordo com RAGHAVENDRA & KULKARNI (2000), que também demonstraram que a administração local de Captopril, LOS ou Ang II potencializou o edema de uma dose submáxima de Cg de forma dose dependente, sugerindo que, na inflamação induzida por Cg, Ang II é formada localmente, modulando, assim, o processo inflamatório subsequente. Estes autores, entretanto, limitaram-se à demonstração do efeito destas substâncias em potencializar o edema, não se aprofundando no estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na participação da Ang II no processo inflamatório.

A Cg é um polissacarídeo sulfatado, derivado de algas marinhas. Ela foi usada como estímulo inflamatório primeiro por Gardner, em 1960, para induzir artrite em coelhos e cobaias. Winter e cols (1962) descreveram a utilidade do edema de pata induzido pela injeção sp de Cg como método de

screening para drogas antiinflamatórias (WINTER et al., 1962; AL-HABOUBI & ZIETLIN, 1983).

A injeção de Cg na pata traseira de animais produz um edema bifásico constituído por uma fase inicial rápida seguida por uma fase tardia mais sustentada. A primeira fase tem início logo após a administração de Cg, prolongando-se por 1h. A segunda tem início após 1h, com pico entre a 3^a e 4^ahs (WINTER *et al.*, 1962; VINEGAR *et al.*, 1969). Em 1969, WILLIS estabeleceu que, durante o edema induzido por Cg, ocorre a liberação seqüencial de histamina, cininas e prostaglandinas (PGs) (AL-HABOUBI & ZIETLIN, 1983). A histamina e a serotonina, derivadas da degranulação de mastócitos, são tidas como principais responsáveis pela vasodilatação e extravasamento de plasma, que acontece até os primeiros 90 min do edema de pata induzido por Cg em ratos, continuando a agir no decorrer de todo o processo (DI ROSA *et al.*, 1971; AL-HABOUBI & ZIETLIN, 1983; DOZEN *et al.*, 1989).

A Cg também estimula a produção local de mediadores pró-inflamatórios, notadamente IL-1 e TNF- α , por células residentes. Agindo sobre leucócitos teciduais e recrutados, IL-1 e TNF- α ativam as cascatas da ciclo e da lipoxigenase, gerando PGs e LTs. Esses mediadores tanto produzem vasodilatação diretamente como atraem neutrófilos ao foco inflamatório produzindo a fase tardia do edema. Portanto, a fase tardia é creditada principalmente ao dano endotelial direto por leucócitos, carreamento de líquido intravascular durante a migração de PMN e ao aumento de permeabilidade vascular induzida por eicosanóides (VINEGAR *et al.*, 1982; BANKS *et al.*, 1984; CALHOUN *et al.*, 1989; WEICHMAN *et al.*, 1989). Nessa fase o edema é maior

e mais prolongado, de forma que, experimentalmente, o edema da Cg é utilizado quando se quer avaliar o efeito de uma intervenção sobre o edema inflamatório dependente de células residentes e de migração celular.

A demonstração de que Ang II induz a potencialização da fase inicial do edema da Cg sugere que ela está agindo via mediadores derivados de mastócitos: histamina e serotonina. Sendo assim, resolvemos investigar o efeito da Ang II no edema de pata induzido por DXT, substância que desencadeia um edema do tipo vascular, onde há degranulação de mastócitos e liberação de mediadores vasoativos. O DXT, diferente da Cg, induz um edema que pode ser detectado já nos primeiros 30 min após sua injeção e cujo fluido apresenta pequena quantidade de proteínas e neutrófilos (LO *et al.*, 1982). A Ang II potenciou de forma significativa o edema de pata do DXT nas primeiras horas, sugerindo que ela pode estar agindo a nível vascular, ou estar causando degranulação de mastócitos e liberação de substâncias vasoativas. O LOS, antagonista de receptores AT1, também potencializou o edema de pata do DXT. Isso nos leva a crer que Ang II foi formada no local do processo inflamatório e, agindo via receptores AT2 não bloqueados, modulou tal processo. Corroborando com tal hipótese, alguns autores relatam que a ativação de receptores AT2 induz, dentre outras ações, a vasodilatação (BARBER *et al.*, 1999; CAREY *et al.*, 2001; TOUYZ & BERRY, 2002). Este efeito pode contribuir para a ação pró-inflamatória da Ang II mediada por receptores AT2 uma vez que, com a vasodilatação, há um conseqüente aumento da pressão hidrostática no interior dos capilares, o que pode levar à saída de fluido para o sítio inflamatório e posterior formação de edema.

Já foi relatado na literatura que a Ang II promove aumento da expressão gênica do fator de permeabilidade vascular em células da vasculatura lisa humana *in vitro* (WILLIAMS *et al.*, 1995). O aumento da expressão desse fator de permeabilidade vascular induzido pela Ang II foi inibido pelo antagonista específico dos receptores AT1, o LOS, sugerindo a participação de receptores AT1 no processo inflamatório (WILLIAMS *et al.*, 1995). Nosso estudo, porém, sugere uma ação antiinflamatória para tais receptores, pois, no modelo do edema de pata da Cg, o LOS potencializou a inflamação causada pela injeção sp de Cg. Uma outra explicação para os resultados obtidos no presente estudo pode ser obtida ao analisarmos o mecanismo de ação de drogas antagonistas de receptores AT1 da Ang II. Alguns trabalhos da literatura creditam parte das ações dessas drogas à inibição da atividade da ECA, que é uma enzima do tipo cininase II, importante na degradação metabólica da BK e de outras cininas (RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000; SCHIEFFER *et al.*, 1994). Sendo assim, o efeito pró-inflamatório do LOS pode estar relacionado à maior concentração de BK, ou mesmo de outros mediadores endógenos que não sejam as cininas (BLAIS *et al.*, 1999), como já foi citado. O efeito pró-inflamatório do LOS pode, ainda, estar relacionado à ação da Ang II, gerada durante o processo inflamatório, sobre os receptores AT2 não-bloqueados, ou mesmo estimulando vias inflamatórias através de mecanismos ainda não esclarecidos, uma vez que os receptores AT1 encontravam-se bloqueados (RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000).

A princípio, poder-se-ia imaginar que as drogas que inibem a ECA teriam efeito antiinflamatório, já que diminuem a quantidade de Ang II formada.

No entanto, o efeito predominante daquelas drogas parece ser o aumento dos níveis de BK, que é uma substância pró-inflamatória. BOURA & SVOLMANIS (1984) observaram que o Captopril, uma droga inibidora da ECA, potencializou o edema de pata induzido tanto pela Cg como pela BK. Os níveis de BK aumentam após a administração de Captopril. Conseqüentemente, a síntese de PGs também é aumentada. Isso explica o efeito pró-inflamatório do Captopril neste modelo. Além disso, WAWROCKA-PAWLAK & DABROWSKI (1999) sugerem que os efeitos colaterais observados durante a terapia com Captopril são conseqüentes da liberação de histamina pelos mastócitos, o que indica mais um possível mecanismo de ação para essa droga.

Algumas linhas de pesquisa postulam que parte dos efeitos farmacológicos das drogas antagonistas de receptores AT1 poderia ser conseqüência da redução da atividade da ECA presente no plasma e nos tecidos (SCHIEFFER e cols, 1994). No entanto, alguns autores encontraram resultados conflitantes com tal afirmativa (DÉCARIE *et al.*, 1996; BLAIS *et al.*, 1999). Segundo esses autores, diferente do Captopril, a contribuição do LOS em alterar a atividade da ECA durante a potenciação da resposta inflamatória da Cg poderia ser desconsiderada, visto que o tratamento crônico com LOS não alterou a quantidade de bradicinina tissular e des-Arg⁹-BK, que é gerada pela injeção de Cg na pata, sugerindo que outros mediadores endógenos, que não sejam as cininas, podem ser responsáveis pelo efeito do LOS em potencializar o edema de pata da Cg. Inclusive SCHIEFFER e cols (1994) sugerem um possível envolvimento de outros componentes do SRA na diminuição da atividade da ECA devido ao tratamento crônico com drogas antagonistas de receptores AT1.

Como o LOS, antagonista de receptores AT1, demonstrou efeito pró-inflamatório no modelo do edema de pata da Cg e do DXT, especula-se que, nestes modelos experimentais, os receptores AT1 exerçam um papel antiinflamatório e que os receptores AT2 participem do processo, ou seja, exerçam um papel pró-inflamatório. De acordo com essa hipótese, o CGP-42112A, agonista dos receptores AT2 da Ang II, promoveu significativa potenciação do edema de pata induzido por Cg em ratos, principalmente nas primeiras horas, sugerindo a participação dos receptores AT2 no efeito amplificador da Ang II na fase inicial do processo inflamatório evocado por Cg e modulado pela Ang II localmente formada.

Embora a maioria dos autores afirme que o CGP-41112A é uma droga agonista dos receptores AT2 (MARTINEAU *et al.*, 1998; MIFUNE *et al.*, 2000; CAO *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001; CAREY *et al.*, 2001; JOHANSSON *et al.*, 2001), há uma outra corrente de autores que descreve esta droga como antagonista de tais receptores (RAGHAVENDRA & KULKARNI, 2000; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2000). Sua atividade farmacológica parece variar, dependendo do tecido da espécie estudada e das diferentes condições experimentais (*in vivo* versus *in vitro*).

Tendo em vista o efeito amplificador da Ang II sobre o edema de pata induzido pela Cg, e sendo este, pelo menos em sua fase tardia, mediado por citocinas e por migração de neutrófilos, decidimos investigar se tais mecanismos estariam envolvidos com o efeito pró-inflamatório da Ang II.

Inicialmente testamos a capacidade da Ang II em modular o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias induzida por Cg *in vivo*. Foram realizadas, então, a dosagem de IL-1 β e TNF- α no tecido da pata dos animais

envolvidos no experimento do edema de pata por Cg. Nossos resultados mostraram que a Cg induziu a síntese de TNF- α já na primeira hora após a injeção e de IL-1, detectada na segunda hora como previamente descrito (CUNHA *et al.*, 2000). A Ang II, por sua vez, não foi capaz de alterar a dosagem destas citocinas induzida pela injeção de Cg na pata dos animais.

A fim de testarmos a capacidade da Ang II de promover aumento da migração de neutrófilos induzida por uma dose submáxima de Cg, trabalhamos com dois modelos experimentais: o de peritonite induzida pela própria Cg e o de edema de pata, também induzido por Cg, que nos forneceu tecido para a dosagem de MPO, enzima presente nos grânulos de neutrófilos, sendo, portanto, uma forma de medir a infiltração neutrofílica no tecido inflamado agudamente. Nesse sentido, detectamos que a Ang II não foi capaz de alterar o aumento da dosagem de MPO induzido pela injeção de Cg na pata de ratos, sugerindo que o efeito pró-inflamatório da Ang II não se deve ao aumento da infiltração de neutrófilos no local da inflamação. Corroborando com este achado, nosso estudo também demonstrou que a Ang II não alterou o grau de migração de leucócitos PMN para a cavidade peritoneal de ratos induzida pela Cg.

Uma vez estimulados, os mastócitos liberam uma série de substâncias que podem ser divididas em duas classes: os mediadores pré-formados, tais como histamina, serotonina (RANG *et al.*, 2003) e uma pequena quantidade de TNF- α (BEIL *et al.*, 1994; BEIL *et al.*, 1996; SCHMIDT-CHOUDHURY *et al.*, 1996) e os mediadores oriundos da chamada síntese “de novo”. Os LTs, as PGs, as citocinas (TNF- α e ILs 3, 4, 5, 6, 8) e as quimiocinas (MIP-1 e CINC-1 e 13) fazem parte desta segunda classe (BANKS

& COLEMAN, 1996; BIEDERMANN *et al.*, 2000; WAKAHARA *et al.*, 2001; ZHONG *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Apesar de a literatura relatar que os grânulos dos mastócitos contêm TNF- α pré-formado, o teste de ELISA feito por nós não detectou a presença significativamente maior desta citocina nas patas dos animais que receberam Ang II e Cg em relação àqueles que receberam apenas Cg. Esse resultado poderia ser explicado pelo fato de que a quantidade de TNF- α que se encontra pré-formada nos grânulos dos mastócitos é pequena (GALLI, 1993) e, portanto, não detectável experimentalmente pelo teste de ELISA. Além disso, como as amostras foram colhidas 1 h após as injeções, não houve tempo suficiente para que houvesse síntese “de novo” de TNF- α . Uma outra explicação poderia ser dada pelo fato de serem os mastócitos células heterogêneas. Conforme o sítio, ou mesmo o tipo de agonista, os mastócitos podem liberar diferentes tipos de mediadores (GALLI, 1993).

Outros estudos já pesquisaram a influência da Ang II sobre a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias, encontrando, em sua maioria, resultados conflitantes com os nossos. De acordo com os resultados de PEETERS e cols (1998), moduladores do SRA, como o Captopril, inibidor do SRA, e o Valsartan, antagonista de receptores AT1, apresentaram potente efeito inibitório sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL- β) induzida por LPS *in vitro*. A citocina IL-1Ra, antiinflamatória, teve sua síntese estimulada por Captopril, enquanto a produção de IL-6 diminuiu com o uso do Valsartan. No entanto, esses resultados foram obtidos com concentrações bastante altas das drogas utilizadas, concentrações estas que não poderiam ser adotadas em uma situação *in vivo*. SCHINDLER e cols (1995) também

encontraram resultados semelhantes. Eles reportaram que o Captopril apresentou ação inibitória sobre a síntese de TNF- α e IL-1 β induzida por LPS. Porém, como no estudo de PEETERS e cols (1998), os efeitos do Captopril sobre a produção de citocinas foram vistos apenas com concentrações acima de 100 μ M. Isso indica que os resultados encontrados também não poderiam ser extrapolados para uma situação *in vivo*.

O tratamento de pacientes hipertensos com Losartan, apesar de reduzir a pressão arterial, também não foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α (SARDO *et al.*, 2004). Esses diferentes efeitos de inibidores da ECA e de antagonistas de receptores AT1 sugerem que a inibição da Ang II não é a única via pela qual essas drogas afetam a produção de citocinas. Essa afirmativa é suportada pela observação de que outros potentes inibidores da ECA, como Ramipril, Perindopril e Lisinopril, não influenciam a produção de citocinas (SCHINDLER *et al.*, 1995). Uma hipótese alternativa seria a de que o Captopril agiria através de sua capacidade de induzir a síntese de prostaglandinas, as quais são potentes inibidores da síntese de citocinas (ENDRES *et al.*, 1996).

A hipótese de que o Valsartan poderia atuar através de outros mecanismos além do bloqueio de receptores AT1 ainda permanece indefinida. FUNAKOSHI e cols (1999) investigaram o efeito da Ang II sobre a produção de IL-6 em cultura de células musculares lisas da vasculatura de ratos *in vitro*. Os autores afirmam que IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e multifuncional. Foi concluído que Ang II potenciou a expressão de IL-6 de forma significativa e dose-dependente. Além disso, este efeito da Ang II foi completamente bloqueado pelo antagonista dos receptores AT1, o CV11974. Porém, o antagonista dos receptores AT2, o PD123319 não mostrou efeito algum.

Embora esse estudo não esclareça o papel da Ang II sobre a expressão de IL-6 *in vivo*, sugere-se que um possível mecanismo de ação das drogas inibidoras da ECA, bem como daquelas antagonistas dos receptores AT1 em prevenir a aterosclerose (IKEDA *et al.*, 1999), seria a inibição do aumento de expressão da IL-6 induzido pela Ang II. Os resultados desse estudo sugerem claramente o papel da Ang II na produção de IL-6, mediando, assim, o processo inflamatório vascular. SCHIEFFER e cols (2000) encontraram resultados semelhantes; os autores demonstraram que Ang II, receptores AT1 e ECA são expressos em sítios estratégicos dentro das placas ateroscleróticas humanas e que Ang II estimula a síntese e liberação de IL-6 *in vitro*. Embora IL-6 seja conhecida como uma citocina antiinflamatória, alguns estudos enfatizam o seu potencial pró-inflamatório como regulador central da inflamação e da diferenciação de macrófagos (BIASSUCI *et al.*, 1996; SCHIEFFER *et al.*, 2000). Como podemos observar, diferente do que ocorreu em nosso estudo, a Ang II promoveu a síntese de citocinas nos modelos citados. Esses resultados conflitantes podem ser, em parte, explicados pelo fato de se tratarem de sítios diferentes de inflamação, além das diferentes condições experimentais.

A selectina-E é uma molécula de adesão intimamente relacionada com a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, sendo inclusive um marcador para avaliação do grau de migração de leucócitos PMN (BRITO & RIBEIRO, 1999). GRAFE e cols (1997) investigaram o papel da Ang II sobre a expressão endotelial de selectina-E *in vitro*. Em células endoteliais coronárias, a Ang II aumentou a expressão de selectina-E de forma estatisticamente significativa. No entanto, em células endoteliais da microvasculatura cardíaca, Ang II induziu apenas um pequeno aumento da expressão de selectina-E. KIM

e cols (1996), ao tratarem células endoteliais provenientes da aorta humana e de coelhos com Ang II demonstraram indução da adesão de monócitos, mas não de neutrófilos a essas células. Esses dados estão de acordo com os nossos resultados, que mostraram a incapacidade da Ang II em alterar o grau de migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por Cg em ratos. Os resultados contraditórios obtidos pelos primeiros autores citados neste parágrafo poderiam ser atribuídos a diversidade de resposta de células endoteliais localizadas em sítios diferentes.

A Ang II, apesar de seu efeito amplificador do edema, não aumentou a síntese de citocinas, nem tampouco a migração de neutrófilos para o sítio da inflamação, além de potencializar o edema de pata da Cg nas primeiras horas, bem como o edema do DXT. Estes achados levaram-nos à hipótese de que Ang II amplificou o edema induzido por estes mediadores através da indução de degranulação de mastócitos e liberação de mediadores vasoativos, como histamina e serotonina, sendo esta última presente apenas em mastócitos de roedores (MALING *et al.*, 1974; DE RESENDE *et al.*, 2001). Para comprovar tal fato, utilizando o mesmo modelo experimental, testamos o efeito da Mepiramina, um anti-histamínico derivado da etilenodiamina e seletivo para receptores do tipo H1 da histamina (KOROLKOVAS *et al.*, 1988). Utilizamos também a Metisergida, um alcalóide semi-sintético derivado do esporão do centeio e antagonista da serotonina (KOROLKOVAS *et al.*, 1988). Ambas reduziram o edema vascular induzido pelo DXT, bem como a potencialização do mesmo pela Ang II. Sendo que a metisergida promoveu uma redução ainda mais acentuada do edema, chegando a reverter quase completamente a ação da Ang II. Este achado está de acordo com dados da literatura, que

demonstram que o edema de pata induzido em ratos depende prioritariamente da liberação de serotonina (MALING *et al.*, 1974; DE RESENDE *et al.*, 2001). Isso provavelmente se deve ao fato de que, em roedores, a serotonina predomina nos grânulos dos mastócitos (MALING *et al.*, 1974; GALLI, 1993). Esses dados sugerem que a amplificação do edema induzida pela Ang II se deve, pelo menos em parte, a mediadores como histamina e serotonina, derivados de mastócitos.

DI ROSA e cols (1971) estudaram os mediadores da inflamação aguda induzida pela Cg em ratos. Com relação a tais mediadores, os autores subdividiram a resposta inflamatória a Cg em três fases distintas. A primeira envolve liberação inicial de histamina e serotonina. A segunda fase é mediada pelas cininas, como a BK, e a terceira é mediada pelas PGs. Tanto histamina quanto serotonina são liberados ao mesmo tempo e em tal concentração que cada amina exerce seu efeito máximo na permeabilidade vascular. Estes autores demonstraram, portanto, que anti-histamínicos ou antagonistas de serotonina, administrados isoladamente, revertem apenas parcialmente o edema de pata da Cg. No edema do DXT, também ocorre degranulação de mastócitos e em roedores, liberação desses dois mediadores (LO *et al.*, 1982). Portanto, isso explica por que em nosso estudo, mepiramina ou metisergida, isoladamente, não foram capazes de reverter completamente o edema vascular DXT.

Dessa forma, resolvemos avaliar o efeito da Ang II sobre a degranulação de mastócitos em dois sítios: na própria pata inflamada pela Cg ou pelo DXT e no mesentério de ratos, sítio com grande população de mastócitos. Assim, colhemos tecido da pata dos animais 1h após a injeção de

Cg e de DXT, uma vez que a degranulação de mastócitos ocorre precocemente nestes edemas (DI ROSA *et al.*, 1971; LO *et al.*, 1982; AL-HABOUBI & ZIETLIN, 1983; DOZEN *et al.*, 1989). As amostras de tecido da região subplantar foram utilizadas para a confecção das lâminas e posterior contagem do percentual de mastócitos degranulados após coloração com azul de toluidina. Demonstramos, então, que a Ang II potenciou de forma significativa a degranulação de mastócitos induzida tanto pelo DXT como pela Cg na pata de ratos *Wistar*. Além disso, Ang II promoveu, em mesentérios de ratos, aumento significativo da degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80, conhecido por liberar histamina de mastócitos (PATON, 1951, 1957; FELDBERG & TALESNIK, 1953; RILEY & WEST, 1956), em concentração submáxima. Mesmo na ausência das substâncias indutoras – Cg, DXT ou 48/80 – a Ang II foi capaz de promover degranulação significativa de mastócitos em relação aos animais que receberam apenas solução salina. Isso sugere que o efeito da Ang II em potencializar o edema de pata da Cg e do DXT deve ser mediado por sua ação em induzir degranulação de mastócitos de forma direta ou indireta. É importante observarmos que, no modelo da degranulação de mastócitos em mesentérios de ratos, a indução da degranulação de mastócitos pela Ang II na ausência do composto 48/80 foi bem mais acentuada quando comparada àquela induzida no modelo de degranulação na pata dos animais. Isso provavelmente se deve à heterogeneidade entre os mastócitos de diferentes sítios (GALLI, 1993).

A indução da degranulação de mastócitos por Ang II, mesmo na ausência de Cg, DXT ou 48/80, abordada no parágrafo anterior, pode parecer conflitante com os resultados obtidos por nós ao trabalharmos com o edema de

pata da Cg e do DXT. Nestes modelos, Ang II, por si só, não foi capaz de induzir aumento do volume do edema. Provavelmente, o método utilizado por nós ao medirmos o volume do edema – pletismômetro – não foi sensível o suficiente para detectarmos o efeito da Ang II, administrada isoladamente, em induzir degranulação de mastócitos.

De acordo com vários estudos a respeito da biologia dos mastócitos (SHIOTA *et al.*, 1997; KATADA *et al.*, 1999; MIYAZAKI & TAKAI, 2001; DOGGRELL & WANSTALL, 2003), uma das conseqüências da degranulação de mastócitos seria a liberação de uma protease – a quimase – que seria responsável pela transformação da Ang I em Ang II. Dados da literatura indicam que apenas a quimase presente em humanos, primatas e cães tem a capacidade de formar Ang II; a quimase de ratos e camundongos teria a capacidade de quebrar a Ang II em fragmentos inativos (FUKAMI *et al.*, 1998). Porém, alguns autores, ao conduzirem pesquisas utilizando *hamsters*, concluíram que a quimase presente em tal espécie também foi capaz de gerar Ang II após degranulação de mastócitos (SHIOTA *et al.*, 1997; KATADA *et al.*, 1999; MIYAZAKI & TAKAI, 2001; DOGGRELL & WANSTALL, 2003). Além disso, segundo SAITO e cols (2003), um determinado tipo de enzima presente em camundongos – a protease-1 – é capaz de clivar a Ang I para formar Ang II. De acordo com o trabalho de JIN e cols (2001), a Ang II produzida pela quimase participa do estado patofisiológico após infarto do miocárdio em *hamsters*. Sendo assim, não se pode descartar a hipótese de que, ao promover a degranulação de mastócitos, a Ang II induz a liberação de uma quimase, responsável pela formação local de mais Ang II, que, por sua vez, amplifica o processo inflamatório. Em situações de normalidade, a ECA desempenha

papel fundamental sobre a produção de Ang II, enquanto a quimase é estocada nos grânulos dos mastócitos em sua forma inativa. A quimase adquire a capacidade de formar Ang II após a degranulação de mastócitos induzida por algum estímulo, como a injúria vascular provocada por cateter descrita no estudo de MIYAZAKI & TAKAI (2001). É necessário que uma maior ênfase seja dada ao mecanismo de ação que envolve degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios. Segundo DOGGRELL & WANSTALL (2003), as drogas inibidoras de quimase podem significar um importante avanço no tratamento da injúria vascular associada à degranulação de mastócitos.

Nossos resultados indicam que, nos modelos utilizados em nossa pesquisa, a Ang II potencializou a inflamação através de mecanismos independentes da migração celular. Além disso, Ang II, LOS e CGP-42112A potenciaram o edema da Cg já nas primeiras horas, bem como aquele induzido por DXT, o que sugere que essas drogas influenciam a fase vascular do edema induzido por essas substâncias, isto é, a fase relacionada com a degranulação de mastócitos e a liberação de mediadores vasoativos. Além de induzir a degranulação de mastócitos, com a conseqüente liberação de aminas vasoativas, a Ang II, ao potenciar a fase precoce do edema da Cg, pode também está promovendo um aumento dos níveis de bradicinina, conhecida por causar vasodilatação e por aumentar a permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de proteínas e fluídos e à formação de edema local. No entanto, esta hipótese não foi testada em nosso trabalho. Esse aumento dos níveis de bradicinina pode também levar à síntese de prostaglandinas

(DÉCARIE *et al.*, 1996), amplificando a resposta inflamatória. Essa é uma importante via a ser investigada em trabalhos futuros.

Esse trabalho sugere que, nos modelos utilizados, a Ang II modulou o processo inflamatório agudo ao interferir em seu componente vascular. Isso apresenta importância clínica relevante, uma vez que cresce o uso de drogas relacionadas com o SRA para o tratamento da hipertensão arterial, que está diretamente relacionada à aterosclerose, na qual a inflamação na parede dos vasos tem papel relevante. Dessa forma, esperamos contribuir para o esclarecimento do papel da Ang II no processo inflamatório, servindo de base científica para testes futuros de ligantes de seus receptores como moduladores inflamatórios em doenças nas quais a inflamação se constitui fator de morbidade.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

O conjunto de dados colhidos em nosso trabalho nos leva a concluir que:

- Ang II amplificou a fase vascular do edema da Cg, bem como o edema do DXT;
- A ação da Ang II em amplificar o edema independe do aumento da indução da síntese de citocinas ou da migração de leucócitos PMN;
- LOS, antagonista de receptores AT1, e CGP-42112A, agonista de receptores AT2, potenciaram a fase precoce do edema da Cg e do DXT, sugerindo a participação de receptores AT2 na amplificação do edema por Ang II formada endogenamente;
- A ação da Ang II sobre o edema é dependente da degranulação de mastócitos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, S. Effector mechanisms of immunoglobulin E-initiated immune reactions. **In: Cellular and Molecular Immunology**. Abas, ABUL K. 4ªEd., Philadelphia: WB Saunders Company, cap. 14, p. 279-313, 2000.

Abraham, S.N.; Malaviya, R. Mast cells in infection and immunity. **Infection and Immunity**, v. 65 (n. 9), p. 3501-08, 1997.

Akishita, M.; Horiuchi, M.; Yamada, H. *et al.* Inflammation influences vascular remodeling through AT₂ receptor expression and signaling. **Physiol. Genomics**, v. 2, p. 13-30, 2000.

Akishita, M.; Iwai, M.; Wu, L. *et al.* Inhibitory effect of AT₂ receptor on coronary arterial remodeling after aortic. **Circulation**, v. 102, p. 1684-89, 2000.

Al-Haboubi, H.A. & Zeitlin, I.J. Re-appraisal of the role of histamine in carragenin-induced paw oedema. **Eur. J. Pharm.**, v. 88, p. 169-76, 1983.

Allen, A.M.; Zhuo, J.; Mendelsohn, F.A.O. Localization and function of angiotensin AT₁ receptors. **American Journal of Hypertension**, v. 13, p. 31S-38S, 2000.

Andersen, S.; Tarnow, L.; Rossing, P. *et al.* Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, v. 57, p. 601-6, 2000.

Banks, B.E.; Vernon, C.A.; Warner, J.A. Nerve growth factor has anti-inflammatory activity in the rat hindpaw oedema test. **Neurosci. Lett.**, v. 47, p. 41-45, 1984.

Banks, E.M.S. and Coleman, J.W. A comparative study of peritoneal mast cells from mutant IL-4 deficient and normal mice: evidence that IL-4 is not essential for mast cell development but enhances secretion via control of IgE binding and passive sensitization. **Citokine**, v. 8 (n. 3), p. 190-6, 1996.

Barber, M.N.; Sampey, D.B.; Widdop, R.E. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, p. 1112-16, 1999.

Basran, G.S.; Morley, P.W.; Turner, W.M. Evidence in man of synergistic interaction between putative mediators of acute inflammation and asthma. **Lancet**, v. 1, p. 935-37, 1982.

Bataller, R.; Sancho-Bru, P.; Ginès, P.; Lora, J.M.; Al-Garawi, A.; Solé, M.; Colmenero, J.; Nicolás, J.M.; Jiménez, W.; Weich, N.; Gutiérrez-Ramos,

J.C.; Arroyo, V.; Rodés, J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. **Gastroenterology**, v. 125 (n. 1), p. 117-25, 2003.

Beil, W.J.; Login, G.R.; Galli, S.J. and Dvorak, A.M. Ultra structural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the cytoplasmic granules of rat peritoneal mast cells with rapid microwave fixation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 94 (n. 3), p. 531-36, 1994.

Beil, W.J.; Login, G.R.; Aoki, M.; Morgan, E.S.; Galli, S.J. and Dvorak, A.M. Tumor necrosis factor-alpha immunoreactivity of rat peritoneal mast cells granules decreases during early secretion induced by compound 48/80: an ultra structural immunogold morphometric analysis. **Int. Arch. Allerg. Immunol.**, v. 109 (n. 4), p. 383-89, 1996.

Beloni, A.S.; Andreis, P.G.; Macchi, V.; Gottardo, G.; Malendowicz, L.K. and Nussdorfer, G.G. Distribution and functional significance of angiotensin II AT1- and AT2- receptor subtypes in the rat adrenal gland. **Endocr. Res.**, v. 24, p. 1-15, 1998.

Bevilacqua, M.P.; Nelson, R.M.; Mannori, G. *et al.* Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 361-78, 1994.

Biassuci, L.; Vitelli, A.; Liuzzo, G.; Altamura, S.; Caliguri, G.; Rebuzzi, A.; Ciliberto, G.; Maseri, A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. **Circulation**, v. 94, p. 874-77, 1996.

Biedermann, T.; Kneilling, M.; Mailhammer, R.; Maier, K.; Sander, C.A.; Kollias, G.; Kunkel, S.L.; Hültner, L. and Röcken, M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. **J. Exp. Med.**, v. 192 (n. 10), p. 1441-51, 2000.

Blais, C.; Leclair, P.; Molinaro, G.; Adam, A. Absence of effect of chronic angiotensin II type 1 receptor blockade on endogenous kinin concentrations-induced paw edema model in the rat. **Peptides**, v. 20, p. 343-52, 1999.

Boulanger, C.M.; Caputo, L; Levy, B.I. Endothelial AT1 -Mediated Release of Nitric Oxide Decreases Angiotensin II Contractions in Rat Carotid Artery. **Hypertension**, v. 26, p. 752-57, 1995.

Boura, A.L.A. & Svolmanis, A.P. Converting enzyme inhibition in the rat by captopril is accompanied by potentiation of carrageenin-induced inflammation. **Br. J. Pharmac.**, v. 82, p. 003-008, 1984.

Bowden, J.J. *et al.* . Substance P (NK1) receptor immunoreactivity on endothelial cells of the rat tracheal mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 404, 1996.

Bradley, P.P.; Rothstein, C.; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60 (n. 3), p. 618-22, 1982.

Brett, J. *et al.* Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med.**, v. 169, p.1977, 1989.

Brito, G.A.C.; Souza, M.H.; Melo-Filho, A.A.; Hewlett, E.L.; Lima, A.A.; Flores, C.A.; Ribeiro, R.A. Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1114-18, 1997.

Brito, G.A.C. e Ribeiro, R.A. Migração de neutrófilos: mecanismos e mediadores. **Pesqui. Med. Fortaleza**, v. 2, p. 108-15, 1999.

Buckley, T.L.; Brain, S.D.; Collins, P.D. *et al.* . Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. **J. immunol.**, v. 146, p. 3424-430, 1991.

Buku, A.; Price, J.A.; Mendlowitz, M. and Mansur, S. Mast cells degranulating peptide binding to RBL-2H3 mast cells receptors and inhibits IgE binding. **Peptides**, v. 22, p. 1993, 2001.

Bumpus, F.M.; Catt, K.J.; Chiu, A.T.; De Gasparo, M.; Goodfriend, T.; Husain, A.; Peach, M.J.; Taylor, D.G.; Timmermans, P. Nomenclature for angiotensin receptors. **Hypertension**, v. 17, p. 720, 1991.

Calhoun, W.; Yu, J.; Sung, A.; Chau, T.T.; Marshall, L.A.; Weichman, B.M.; Carlson, R.P. Pharmacologic modulation of D-49 phospholipase A2-induced paw edema in the mouse. **Agents Actions**, v. 27, p. 418-21, 1989.

Cao, Z.; Dean, R.; Wu, L.; Casley, D.; Cooper, M.E. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. **Hypertension**, v. 34, p. 408-14, 1999.

Cao, Z.; Kelly, D.J.; Cox, A.; Casley, D.; Forbes, J.M.; Martinello, P.; Dean, R.; Gilbert, R.E.; Cooper, M.E. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. **Kidney Int.**, v. 58, p. 2437-51, 2000.

Carey, R.M.; Howell, N.L.; Jin, H.; Siragy, H.M. Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. **Hypertension**, v. 38, p. 1272-77, 2001.

Cheng, H.F.; Wang, J.L.; Zhang, M.Z.; Miyazaki, Y.; Ichikawa, I.; McKanna, J.A.; Harris, R.C. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. **J. Clin. Invest.**, v. 103, p. 953-61, 1999.

Collins, T. Acute and Chronic Inflammation. In: Contran, R.S.; Kumar, V. and Collins, T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6^a ed. WB Saunders Company. Philadelphia, 1999.

Cotran, R.S.; Briscoe, D.M.: Endothelial cells in inflammation. In: Kelley, W. *et al.* (eds). Textbook of Rheumatology, 5^a ed. WB Saunders Company. Philadelphia, p. 183-98, 1997.

Crunkhorn, P.; Willis, A.L. Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 41, p. 49-56, 1971.

Cunha, J.M.; Cunha, F.Q.; Poole, S.; Ferreira, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br J Pharmacol.**, v.130 (n. 6), p.1418-24, 2000.

Davies, P.; MacINTYRE, D.E. Prostaglandins and Inflammation. In: Gallin, J.I. Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press. Cap. 7, p.123-38, 1992.

Décarie, A.; Adam, A. and Couture, R. Effects of Captopril and Icatibant on Bradykinin (BK) and des[Arg⁹] BK in Carrageenan-Induced Edema. **Peptides**, v. 17 (n. 6), p. 1009-15, 1996.

De Gasparo, M.; Catt, K.J.; Inagami, T. *et al.* International union of pharmacology, 23: the angiotensin II receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 415-72, 2000.

De Resende, M.A.; Pimenta Dos Rei, W.G.; Pereira, L.S.; Ferreira, W.; Perez Garcia, M.H.; Santoro, M.M.; Nogueira de Francischi, J. Hyperalgesia and edema responses induced by rat peripheral blood mononuclear cells incubated with carrageenin. **Inflammation**, v. 25, p. 277-85, 2001.

Diep, Q.N.; Amiri, F.; Touys, R.M.; Cohn, J.S.; Endemann, D.; Neves, M.F.; Schiffrin, E.L. PPARalpha activator effects on AngII-induced vascular oxidative stress and inflammation. **Hypertension**, v. 40 (n. 6), p. 866-71, 2002.

Di Rosa, M.; Giroud, J.P.; Willoughby, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Path.**, v. 104, p. 15-29, 1971.

Doggrell, S.A.; Wanstall, J.C. Will chymase inhibitors be the next major development for the treatment of cardiovascular disorders? **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v. 12 (n. 8), p. 1429-32, 2003.

Dozen, M.; Yamaki, K.; Oh-Ishi, S. Captopril uncovers kinin-dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenin-induced rat pleurisy. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 51, p. 101-05, 1989.

Dvorak, A.M. New aspects of mast cell biology. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 1-9, 1997.

Endres, S.; Whitaker, R.E.D.; Ghorbani, R.; Meydani, S.N. & Dinarello, C.A. Oral aspirin and ibuprofen increase cytokine-induced synthesis of IL-1(beta) and tumor necrosis factor-(alpha) *ex vivo*. **Immunology**, v. 87, p. 264, 1996.

Feldberg, W., Talesnik, J. Reduction in tissue histamine by compound 48/80. **J. Physiol.** (London), v. 120, p. 550-68, 1953.

Feng, D. *et al.* . Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine and serotonin. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1981, 1996.

Ferreira, S.H.; Moncada, S.; Parsons, M. & Vane, J.R. The concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. **Br. J. Pharmac.**, v. 52, p. 108P, 1974.

Frossi, B.; De Carli, M.; Pucillo, C. The mast cell: an antenna of the microenvironment that directs the immune response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75 (n. 4), p. 579-85, 2004.

Fukami, H.; Okunish, H.; Miyazaki, M. Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 4 (n. 6), p. 439-53, 1998.

Fukuishi, N.; Sakaguchi, M.; Matsuura, S.; Nakagawa, C.; Akagi, R. and Akagi, M. The mechanism of compound 48/80-induced superoxide generation mediated by A-kinase in rat peritoneal mast cells. **Biochem. Mol. Med.**, v. 61, p. 107-13, 1997.

Funakoshi, Y.; Ichiki, T.; Ito, K.; Takeshita, A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 34 (n. 1), p. 118-25, 1999.

Galli, S.J. New concepts about the mast cells. In: Flier, S.J.; Underhill, L.H. (eds). *Seminars in Medicine of Beth Israel Hospital, Boston. The New England Journal of Medicine*, v. 328 (n. 4), p. 257-65, 1993.

Gallin, J.I.; Goldstein, I.M.; Snyderman, R. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York. Raven Press, p. 1186p, 1992.

Grafe, M.; Auch-Schwelk, W.; Zakrzewicz, A.; Regitz-Zagrosek, V.; Bartsch, P.; Graf, K.; Loebe, M.; Gaehtgens, P.; Fleck, E. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-Selectin. **Circ. Res.**, v. 81, p. 804-11, 1997.

Griendling, K.K.; Lassegue, B.; Alexander, R.W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 281-306, 1996.

Grützkau, A.; Krüger-Krasagakes, S.; Baumeister, H.; Schwanz, C.; Kögel, H.; Welker, P.; Lippert, U.; Henz, B.M.; Möller, A. Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF. **Jog. Mol. Biol. Cell.**, v. 4, p. 875-84, 1998.

Hirayama, K.; Fukuyama, K.; Epstein, W.L. Angiotensin II producing proteases from granulomatous tissue reaction in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 96, p. 553-57, 1990.

Horiuchi, M.; Hayashida, W.; Kambe, T.; Yamada, T. & Dzau, V.J. Angiotensin 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 19022-26, 1997.

Horiuchi, M.; Akishita, M.; Dzau, V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. **Hypertension**, v. 33, p. 613-22, 1999.

Ichiki, T.; Kambayashi, Y.; Inagami, T. Differential inducibility of angiotensin II AT₂ receptor between SHR and WKY vascular smooth muscle cells. **Kidney Int. Suppl.**, v. 55, p. S14-7, 1996.

Ikeda, U.; Ikeda, M.; Seino, Y.; Takahashi, M.; Kano, S.; Shimada, K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 92, p. 213-18, 1999.

Jaszewski, R.; Tolia, V.; Ehrinpreis, M.N. *et al.* Increased colonic mucosal angiotensin I and II concentrations in Crohn's colitis. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1543-48, 1990.

Jin, D.; Takai, S.; Yamada, M.; Sakaguchi, M.; Yao, Y.; Miyazaki, M. Possible roles of cardiac chymase after myocardial infarction in hamsters hearts. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 86 (n. 2), p. 203-14, 2001.

Johansson, B.; Holm, M.; Ewert, S.; Casselbrant, A.; Pettersson, A.; Fändriks, L. Angiotensin II type 2 receptor-mediated duodenal mucosal alkaline secretion in the rat. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280 (n. 6), p. G1254, 2001.

Jones, S.E.; Kelly, D.J.; Cox, A.J.; Zhang, Y.; Gow, R.M.; Gilbert, R.E. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. **Kidney Int.**, v. 64 (n. 3), p. 906-13, 2003.

Katada, J.; Muramatsu, M.; Hayashi, M.; Hattori, M. Role of mast cell chymase in angiotensin-induced vascular contraction of hamster cheek pouch microvessels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 379 (n. 1), p. 63-72, 1999.

Kato, H.; Suzuki, H.; Tajima, S.; Ogata, Y.; Tominaga, T.; Sato, A.; Saruta, T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, v. 9, p. 17-22, 1991.

Kim, J.A.; Berliner, J.A.; Nadler, J.L. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 862-68, 1996.

Klett, C.; Hellmann, W.; Ganten, D.; Hakenthal, E. Tissue distribution of angiotensinogen mRNA during experimental inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 183-97, 1993.

Konstam, M.A. *et al.* Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. **Circulation**, v. 86, p. 431, 1992.

Korolkovas, A., Burckhalter, J.H. Química farmacêutica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 347-492, 1988.

Lipowsky, H.H. Leukocyte margination and deformation in postcapillary venules. In: Granger, D.N.; Schmid-Schonbein, G.W. (eds). Physiology and Pathophysiology of leukocyte Adhesion. New York, Oxford University Press, p. 130-47, 1996.

Lo, T.N.; Almeida, A.P. and Beaven, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. PET.**, v. 221 (n. 1), p. 261-67, 1982.

Luft, F.C. Workshop: Mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. **Hypertension**, v. 37 (2 part 2), p. 594-98, 2001.

Lukacs, N.W.; Strieter, R.M.; Chensue, S.W.; Dunkel, S.L. Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, p. 13-17, 1996.

Maling, H.M.; Webster, M.E.; Williams, M.A.; Saul, W.; Anderson, J.R. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 191 (n. 2), 1974.

Majno, G.; Palade, G.E. Studies on inflammation: I. the effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 571, 1961.

Martin, M.F.; Surrall, K.E.; McKenna, F.; Dixon, J.S.; Bird, H.A.; Wright, V. Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis? **Lancet**, v.3, p. 1325-28, 1984.

Martineau, D.; Lamouche, S.; Briand, R.; Yamaguchi, N. Functional involvement of angiotensin AT₂ receptor in adrenal catecholamine secretion in vivo. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 77, p. 364-74, 1999.

Matsubara, H. Pathophysiological role of Ang II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. **Circ. Res.**, v. 83, p. 1182-91, 1998.

Matsusaka, T. & Ichikawa, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 395-412, 1997.

Mavrikakis, M.E.; Vaiopoulos, G.; Papantoniou, B. *et al.* Plasma renin activity as a marker of renovascular injury in patients with rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 14, p. 613-17, 1996.

Medzhitov, R. and Janeway, C. Jr. Innate immunity. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 338-44, 2000.

Mervaala, E.M.A.; Muller, D.N.; Park, J.K.; Schmidt, F.; Lohn, M.; Breu, V.; Dragun, D.; Ganten, D.; Haller, H.; Luft, F.C. Monocyte Infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. **Hypertension**, v. 33 (part II), p. 389-95, 1999.

Mezzano, S.; Droguett, A.; Burgos, M.E.; Ardiles, L.G.; Flores, C.A.; Aros, C.A.; Caorsi, I.; Vio, C.P.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J. Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. **Kidney Int. Suppl.**, v. 88, p. S64-70, 2003.

Mifune, M.; Sasamura, H.; Shimizu-Hirota, R.; Miyazaki, H.; Saruta, T. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 36, p. 845-50, 2000.

Migliorisi, G.; Folkes, E.; Pawlowski, N. *et al.* *In vitro* studies of human monocyte migration across endothelium in response to leucotriene B₄ and fMet-Leu-Phe. **Am. J. Pathol.**, v. 127, p. 157-67, 1987.

Miyazaki, M.; Takai, S. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. **Hypertens. Res.**, v. 24 (n. 3), p. 189-93, 2001.

Muller, D.N.; Dechend, R.; Mervaala, E.M.A.; Park, J.K.; Schmidt, F.; Fiebeler, A.; Theuer, J.; Breu, V.; Ganten, D.; Haller, H.; Luft, F.C. NF- κ B inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. **Hypertension**, v. 35 (1, Part 2), p. 193, 2000.

Nakajima, M.; Hutchinson, H.; Fujinaga, M. *et al.* The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain of function study using in vivo gene transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 10663-67, 1995.

Ohnaka, K.; Numaguchi, K.; Yamakawa, T.; Inagami, T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 35 (1, Part 1), p. 68-75, 2000.

Oliani, S.M.; Lim, L.H.K.; Chistian, H.C.; Pell, K.; Das, A.M. and Perretti, M. Morphological alteration of peritoneal mast cells and macrophages in the mouse peritoneal cavity during the early phases of an allergic inflammatory reaction. **Cell. Biol. Int.**, v. 25 (n. 8), p. 795-803, 2001.

Oliveira, S.H.P.; Costa, C.H.S.; Ferreira, S.H. and Cunha, F.Q. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB₄, TNF- α , IL-8 and PAF. **Inflamm. Res.**, v. 51, p. 144-53, 2002.

Parkin, J. and Cohen, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-89, 2001.

Paton, W.D.M. Compound 48/80, a potent histamine liberator. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 499-508, 1951.

Paton, W.D.M. Histamine released by compounds of simple chemical structure. **Pharmacol. Rev.**, v. 9, p. 269-328, 1957.

Peeters, A.C.T.M.; Netea, M.G.; Kullberg, B.J.; Thien, T.; Van Der Meer, J.W.M. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. **Immunology**, v. 94 (n. 3), p. 376-79, 1998.

Piqueras, L.; Kubes, P.; Alvarez, A.; O'Connor, E.; Issekutz, A.C.; Esplugues, J.V.; Sanz, M.J. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT₁ and AT₂ receptor-mediated P-selectin upregulation. **Circulation**, v. 102 (n. 17), p. 2118-23, 2000.

Pober, J.S.; Cotran, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. **Transplantation**, v. 50, p. 537-44, 1990.

Qi, Z.; Hao, C-M.; Langenbach, R.I.; Breyer, R.M.; Redha, R.; Morrow, J.D. and Breyer, M.D. Opposit effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.**, v. 110 (n. 1), p. 61-69, 2002.

Raghavendra, V.; Kulkarni, S.K. AT₁ receptor antagonism enhances angiotensin-II- facilitated carrageenan-induced paw edema. **Methods Find Clin. Pharmacol.**, v. 22, p. 633-36, 2000.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. Local hormones, inflammation and immune reactions. In: *Pharmacology*. 5^{ed}. Churchill Livingstone. Edinburgh, 2003.

Reid, I.A. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. E763, 1992.

Ribeiro, R.A.; Souza-Filho, M.V.P.; Souza, M.H.L.P.; Oliveira, S.H.P.; Costa, C.H.S.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H.P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 112, p. 27-35, 1997.

Riley, J.F.; West, G.B. Skin histamine: its location in the tissue mast cells. **Arch. Dermatol.** v. 74, p. 471-78, 1956.

Rocha e Silva, M.O. A brief history of inflammation. In: Vane, J.R.; Ferreira, S.H. (ed). Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, v. 50 (1), p. 6-25, 1978.

Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Rupérez, M.; König, S.; Wittig, B.; Egido, J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor [Kappa] B through AT₁ e AT₂ in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. **Circ. Res.**, v. 86, p. 1266-72, 2000.

Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Suzuki, Y.; Rupérez, M.; Egido, J. Proinflammatory actions of angiotensins. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 10, p. 321-29, 2001.

Sadoshima, J. Cytokine actions of angiotensin II. **Circ. Res.**, v. 86 (n. 12), p. 1187-89, 2000.

Saito, K.; Muto, T.; Tomimori, Y.; Imajo, S.; Maruoka, H.; Tanaka, T.; Yamashiro, K.; Fukuda, Y. Mouse mast cell protease-1 cleaves angiotensin I to form angiotensin II. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 302 (n. 4), p.773-77, 2003.

Sardo, M.A.; Castaldo, M.; Cinquegrani, M.; Bonaiuto, M.; Fontana, L.; Campo, S.; Campo, G.M.; Altavilla, D.; Saitta, A. Effects of AT₁ receptor antagonist losartan on sICAM-1 and TNF-alpha levels in uncomplicated hypertensive patients. **Angiology**, v. 55 (n. 2), p. 195-203, 2004.

Schelling, P.; Fischer, H.; Ganten, D. Angiotensin and cell growth: A link to cardiovascular hypertrophy? **J. Hypertens.**, v. 9, p. 3, 1991.

Schieffer, B.; Wirger, A.; Meybrunn, M. *et al.* Comparative effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blocked on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. **Circulation**, v. 89, p. 2273-82, 1994.

Schieffer, B.; Schieffer, E.; Hilfiker-Kleiner, D.; Hilfiker, A.; Kovanen, P.; Kaartinen, M.; Nussberger, J.; Harringer, W.; Drexler, H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques:

potential implications for inflammation and plaque instability. **Circulation**, v. 101 (n. 12), p. 1372-78, 2000.

Schindler, R.; Dinarello, C.A. and Koch, K-M. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumor necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, v. 7 (n. 6), p.526-33, 1995.

Schmidt-Choudhury, A.; Furuta, G.T.; Lavigne, J.A.; Galli, S.J. and Wershil, B.K. The regulation of tumor necrosis factor- α production in murine mast cells: pentoxifyline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF- α by distinct mechanisms. **Cell. Immunol.**, v. 171, p. 140-46, 1996.

Sedgwick, A.D.; Willoughby, D.A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Bonta IL, Bray MA, Parnham MJ (ed). Handbook of Inflammation. Elsevier, v. 5, p. 27-47, 1985.

Seyedi, N.; Xu, X.B.; Najiletti, A.; Hintze, T.H. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. **Hypertension**. v. 26, p.164-170, 1995.

Shiota, N.; Fukamizu, A.; Takai, S.; Okunishi, H.; Murakami, K.; Miyazaki. Activation of angiotensin II-forming chymase in the cardiomyopathic hamster heart. **J. Hypertens.**, v. 15 (n. 4), p. 431-40, 1997.

Simon, M.R.; Kamlay, M.T.; Desai, S.G.; Majumdar, A.P. Angiotensin II augmentation of tyrosine kinase activity in human adherent mononuclear cells. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, v. 45, p. 48-55, 1991.

Snyderman, R.; Uhuig, R.J. Chemoattractant stimulus-response coupling. In: Gallin, J.I. (ed). Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. New York: Raven Press. p. 421-41, 1992.

Souza, G.E.P.; Ferreira, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents-Actions**, v. 17, p. 1, 1985.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte circulation and leukocyte migration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301, 1994.

Stossel, T.P. On the crawling of animal cells. **Science**, v. 260, p. 1045, 1993.

Suzuki, Y.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J. Angiotensin II: a double-edged sword in inflammation. **J. Nephrol.**, v. 13 (Suppl 3), p. S101-10, 2000.

Takano, M.; Itoh, N.; Yayama, K.; Yamano, M.; Ohtani, R.; Okamoto, H. Interleukin-6 as a mediator responsible for inflammation induced increase in plasma angiotensinogen. **Biochem. Pharmacol.**, v. 45, p. 201-06, 1996.

Tamarat, R.; Silvestre, J.S.; Durie, M.; Levy, B.I. Angiotensin II angiogenic effect *in vivo* involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. **Lab. Invest.**, v. 82 (n. 6), p. 747-56, 2002.

Theuer, J.; Dechend, R.; Muller, D.N.; Park, J-K.; Fiebeler, A.; Barta, P.; Ganten, D.; Haller, H.; Dietz, R. And Luft, F.C. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. **B.M.C. Cardiovasc. Disord.**, v. 2 (n. 1), p. 3, 2002.

Thureson-Klein, A.; Hedqvist, P.; Lindborn, L. Ultrastructure of polymorphonuclear leukocytes in postcapillary venules after exposure to leucotriene B₄ *in vivo*. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 122, p. 221-24, 1984.

Tsikouris, J.P.; Cox, C.D. Pharmacologic blockade of the renin-angiotensin system: vascular beyond commonly understood pharmacologic actions. **Pharmacotherapy**, v. 23 (n. 9), p. 1141-52, 2003.

Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 34, p. 976-82, 1999.

Touyz, R.M.; Endermann, D.; He, G.; Li, J-S.; Schiffrin, E.L. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. **Hypertension**, v. 33 (Part 2), p. 366-73, 1999.

Touyz, R.M. & Berry, C. Recent advances in angiotensin II signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35 (n. 9), p. 1001-15, 2002.

Vinegar, R.; Schreiber, W.; Hugo, R. Biphasic development of carrageenan oedema in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 96-103, 1969.

Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L.; Voelker, F.A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. **Fed. Proc.**, v. 41, p. 2588-95, 1982.

Viswanathan, M.; Saavedra, J.M. Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. **Peptides**, v. 13, p. 783-86, 1992.

Viswanathan, M.; Jöhren, O.; de Oliveira, M.; Saavedra, J.M. Increased non-angiotensin II [¹²⁵I] CGP 42112 binding in rat carotid artery after balloon injury. **Peptides**, v. 17, p. 695-99, 1996.

Wakahara, S.; Fujil, Y.; Nakao, T.; Tsuritani, K.; Hara, T.; Saito, H. and Ra. C. Gene expression profiles for FcεRI, cytokines and chemokines upon FcεRI activation in human cultured mast cells derived from peripheral blood. **Citokine**, v. 16 (n. 4), p. 143-52, 2001.

Walsh, D.A.; Hu, D.E.; Wharton, J.; Catravas, J.D.; Blake, D.R.; Fan, T.P. Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin-I

converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 1302-11, 1997.

Wawrocka-Pawlak, M.; Dabrowski, R. The effect of captopril on histamine release from purified rat mast cells. **Inflamm. Res.**, v. 48 (n. 5), p. 262-64, 1999.

Wedmore, C.V.; Williams, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, v. 289, p. 646-50, 1981.

Weichman, B.M.; Berkenkopf, J.W.; Marshall, L.A. Phospholipase A2-induced pleural inflammation in rats. **Int. J. Tissue React.**, v. 11, p. 129-36, 1989.

Weinstock, J.V.; Ehrinpreis, M.N.; Boros, D.L.; Gee, J.B. Effect of SQ 14225, an inhibitor of angiotensin-I converting enzyme, on the granulomatous response to *schistosoma mansoni* eggs in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 931-36, 1981.

Williams, B.; Baker, A.Q.; Gallacher, B.; Lodwick, D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 25 (n. 5), p. 913-17, 1995.

Williams, T.J.; Jose, P.J. Mediation of increased vascular permeability after complement activation. **J. Exp. Med.**, v. 153, p. 136-53, 1981.

Williams, T.J.; Morley, J. Prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. **Nature**, v. 246, p. 215-17, 1973.

Williams, T.J.; Peck, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. **Nature**, v. 270, p. 530-32, 1977.

Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carragenin-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v. 111, p. 544-47, 1962.

Wu, L.; Iwai, M.; Nakagami, H. Li. Z.; Chen, R.; Suzuki, J.; Akishita, M., de Gasparo, M.; Horiuchi, M. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with Valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. **Circulation**, v. 104 (n. 22), p. 2716-21, 2001.

Zhong, H.; Chunn, J.L.; Volmer, J.B.; Fozard, J.R.; Blackburn, M.R. Adenosine-mediated mast cell degranulation in adenosine desaminase-deficient mice. **J. PET.**, v. 298 (n. 2), p. 433-40, 2001.