

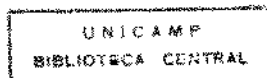
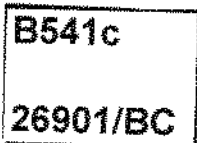
Luciana Bizeto

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
NOVOS INIBIDORES DE CALICREÍNAS
TISSULARES**

Orientador - Prof. Dr. Edson Antunes

**Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade
de Ciências Médicas da UNICAMP como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Farmacologia**

Campinas - 1995


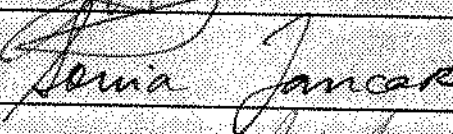



Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antunes 
2. Prof. Dr. Sonia Jancar 
3. Prof. Dr. Mario José Adalberto Sood 

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

13/12/95

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas -UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Luciana Bizeto.

Campinas, 13 de dezembro de 1995


Prof. Dr. Edson Antunes

Orientador -

“O primeiro passo é uma intuição - que surge como uma explosão - , em seguida aparecem os problemas. Falha isto e aquilo, vão aparecendo os pequenos erros e dificuldades. Meses de ansiosa observação, estudo e trabalho são necessários antes que o sucesso ou o fracasso seja alcançado.” *Thomas Edison* (1847-1931).

*Aos meus primos Araci, Bianca e Gilson, pelo abrigo
e carinho que a mim concederam durante o
desenvolvimento deste trabalho. Não tendo preço esta
amizade, dedico humildemente esta dissertação de
mestrado.*

*Aos meus Pais, Arcênio Bizeto e Norma Roncoletta
Bizeto por estarem sempre ao meu lado, e a quem
devo tudo nesta vida ...*

“A ciência é a procura da verdade; não é um jogo no qual uma pessoa tenta bater seus oponentes, prejudicar outras pessoas.” *Linus Carl Pauling* (1910-1994).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela orientação, oportunidade e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela oportunidade concedida para a minha participação neste trabalho.

À Dra. Eline Prado e Dr. Luís Juliano do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina) pela síntese dos inibidores de calicreínas tissulares usados neste estudo.

Ao Dr James Burton pela doação do KIZD-06.

À Dra. Maria Tereza Mathias Baptista do Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas - UNICAMP, por permitir o uso do contador gama.

Às amigas Suzana, Aldete e Rodrigo, pela amizade e auxílio técnico.

Aos amigos Marta (Marta Passaralha), Ana Maria (Aninha Tudo di Bom), Iramaia, Heloisa (Helô), Ronilson (Rovilson), Heitor (Heitore), Luís Donato (Missiê Donatô), Rogério (Little Carrot), Wellington (Vellintinho), Anicleto Poli (Nike Náusea), Prof. Marcos Fontana, Profa. Albetiza, Sérgio (Eficiência), Luciana Natan (Lu Natan), ..., pelo carinho e amizade.

À Maria das Dores (Dorinha Secretária) pela amizade e prestatividade.

Aos funcionários e professores deste Departamento que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas em pró a realização deste trabalho.

À minha avó Izabel Morilo Roncoletta e aos meus amigos Dona "Izabelzinha" e Marcelo (todos *in memoriam*), pelo carinho, amizade e confiança que sempre tiveram por mim.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE DROGAS

RESUMO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Calicreínas	2
1.2 - Calicréna Plasmática	3
1.3 - Calicreínas Tissulares	4
1.4 - Cininas	8
1.5 - Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	10
1.6 - Inibidores de Calicreínas Tissulares	12
2 - OBJETIVOS	14
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 - Medida da permeabilidade vascular na microcirculação cutânea de coelhos	16
3.2 - Síntese de inibidores de calicreína tissular (ESPs)	17
3.3 - Ensaio de farmacocinética	18
3.4 - Diálise do veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>	18
3.5 - Purificação parcial da calicreína tissular de coelho	19
3.6 - Purificação parcial da calicreína plasmática de coelho	20

3.7 - Medida da pressão arterial de coelho	22
3.8 - Análises estatísticas	23
4 - RESULTADOS	24
4.1 - Efeito de caliceínas plasmáticas e tissulares sobre a permeabilidade vascular	25
4.2 - Efeito de novos inibidores de caliceínas tissulares no aumento de permeabilidade vascular induzido pela caliceína pancreática de porco	27
4.3 - Cinética de desaparecimento do ESP6	36
4.4 - Efeito do P-F-p-NH ₂ (KIZD) sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela CPP	39
4.5 - Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> e inibidores de caliceínas tissulares	39
4.6 - Efeito do ESP6 sobre a pressão arterial de coelhos	40
5 - DISCUSSÃO	45
6 - CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ABSTRACT	66

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Aumento de permeabilidade vascular induzido por caliceínas em pele de coelhos. 26

Figura 2. Efeito do ESP5 (■), ESP6 (□), ESP8 (▼), ESP9(▲) e ESP11 (○) sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela caliceína de pâncreas de porco. 30

Figura 3. Efeito do ESP1, ESP3, ESP4, ESP7 e ESP10 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela caliceína de pâncreas de porco.. 33

Figura 4. Efeito do pré-tratamento com ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular produzido pela caliceína de pâncreas de porco e bradicinina em pele de coelho 34

Figura 5. Efeito da administração endovenosa do ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por caliceína pancreática de porco, bradicinina, histamina, fator ativador de plaquetas e veneno de *Phoneutria nigriventer*. 37

Figura 6: Tempo de degradação do ESP6. 38

Figura 7. Efeito do KIZD-06 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por caliceína pancreática de porco, caliceína urinária de coelho, veneno de *Phoneutria nigriventer* e bradicinina. 41

Figura 8. Efeito do ESP5 e ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, calicreína pancreática de porco e bradicinina. 43

Tabela 1: Sequência de aminoácidos, valores de K_i e peso molecular dos diferentes inibidores de calicreína tissular utilizados neste estudo. 29

Tabela 2: Efeito do ESP5, ESP6 e ESP8 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por bradicinina e histamina em presença de PGE_1 . 31

Tabela 3: IC_{25} dos inibidores de calicreína sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por calicreína pancreática de porco 32

Tabela 4: Efeito da infusão do KIZD-06 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por calicreína de pâncreas de porco, bradicinina e veneno de *Phoneutria nigriventer*. 42

Tabela 5: Efeito do ESP6 sobre a hiotensão induzida pela acetilcolina e bradicinina em coelhos. 44

LISTA DE ABREVIACÕES

ACh	Acetilcolina
Bk	Bradicinina
CPC	Caliceína plasmática de coelho
CPP	Caliceína de pâncreas de porco
CUC	Caliceína urinária de coelho
His	Histamina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PN	<i>Phoneutria nigriventer</i>
VPN	Veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i>

LISTA DE DROGAS

Substância	Procedência
Acetilcolina	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
Azul de Evans	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
Bradicinina	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
Calicreína de pâncreas de porco	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
Heparina	Roche (SP, Brasil)
Histamina	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
I ¹²⁵ - Albumina humana	Amersham (Bucks, EUA)
Membranas de diálise	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
PAF	Sigma (St.Louis, MO, EUA)
Pentobarbital sódico (Sagatal)	May & Baker (Essex, GB)
Prostaglandina E ₁	Upjohn Co. (Kalamazoo, EUA)
Xilocaína	Cristália (SP, Brasil)

O veneno liofilizado de *Phoneutria nigriventer* foi fornecido pela seção de artrópodos do Instituto Butantan, São Paulo - Brasil. O veneno foi coletado das aranhas por estimulação elétrica e dessecado em um dessecador a vácuo contendo tabletes de hidróxido de sódio, à temperatura ambiente.

O composto KIZD-06 foi sintetizado no laboratório da "Rational Drug Design" da Boston University Medical Center, pelo Dr^o. James Burton.

Os compostos ESP1, ESP3, ESP5, ESP6, ESP7, ESP8, ESP9, ESP10 e ESP11 foram sintetizados nos laboratórios dos professores Elíne S. Prado e Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

RESUMO

Neste trabalho, investigamos o efeito de calicreínas tissulares e plasmática sobre a permeabilidade vascular em pele de coelhos *in vivo*. A seguir, investigamos o efeito de dez novos inibidores de calicreína tissular sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por calicreínas tissulares. O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* foi também usado como agente edematogênico em virtude da capacidade do mesmo de aumentar a permeabilidade vascular em coelhos por um mecanismo dependente da ativação do sistema de calicreína tissular.

Nossos resultados mostraram que calicreínas tissulares, tais como a calicreína pancreática de porco (CPP; 0.1 µg/sítio) e a calicreína urinária de coelho (10 ng/sítio) induzem extravasamento significativo de proteínas plasmáticas quando administradas na presença do vasodilatador prostaglandina E₁ (PGE₁). Ao contrário, a calicreína plasmática de coelho não causou extravasamento de proteínas, mesmo na presença de PGE₁.

Nas concentrações de 3-200 nmol/sítio, a administração local dos inibidores de calicreínas tissulares ESP5 (K_i= 0.1), ESP6 (K_i= 0.7), ESP8 (K_i= 7.8), ESP9 (K_i= 0.3) e ESP11 (K_i=0.3) causou uma inibição dose-dependente do extravasamento de proteínas induzido pela CPP. O composto mais potente foi o ESP6 (IC₂₅ = 7.8 nmol/sítio) seguido pelo ESP5 (IC₂₅ = 14.2 nmol/sítio), ESP8 (IC₂₅ = 25 nmol/sítio), ESP9 (IC₂₅ = 30 nmol/sítio) e ESP11 (IC₂₅ = 50.4 nmol/sítio). Os compostos ESP1 (K_i=0.5), ESP3 (K_i=0.4), ESP7 (K_i=1.1) e

ESP10 ($K_i=4.6$) não modificaram de modo significativo o aumento de permeabilidade vascular induzido pela CPP. Quando injetado endovenosamente, o ESP6 ($4 \mu\text{mol/Kg}$) também produziu uma inibição significativa (48%) do edema induzido pela CPP. Entretanto, o edema induzido pelo PAF, histamina e bradicinina também foram significativamente reduzidos pela administração endovenosa do ESP6 (52.3%, 48.8%, 47.2% de inibição, respectivamente). Este efeito inibitório "inespecífico" não foi devido a um possível efeito hipotensor do composto visto que o mesmo não modificou a pressão arterial dos animais. O ESP5 (200 nmol/sítio) e o ESP6 (200 nmol/sítio) também foram eficazes em inibir o edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, embora esta inibição tenha sido significativamente menor do que aquela observada para a CPP. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o ESP6 possa se constituir em uma ferramenta farmacológica importante para o estudo do sistema de calicreína tissular.

INTRODUÇÃO

1.1. Calicreínas

As calicreínas representam um grupo de serino proteases encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos. Tais enzimas estão divididas em dois grupos: tissular e plasmático (Fiedler, 1979; Movat, 1979) que diferem entre si quanto ao peso molecular, ponto isoelétrico, especificidade de substrato, tipo de cinina liberada e importância funcional (Webster, 1970; Fritz et al., 1977; Bhoola et al., 1992).

Por ação enzimática, as calicreínas liberam peptídeos vasoativos a partir de substratos denominados cininogênios. As enzimas que possuem a capacidade de clivar o cininogênio e liberar cininas são denominadas cininogenases (termo proposto por Eugene Werle et al, 1960). Este termo genérico inclui enzimas tais como a calicreína plasmática, calicreína tissular, tripsina, plasmina e veneno de *Bothrops jararaca*. Em mamíferos, dois tipos de cininogênios têm sido descritos: o de alto peso molecular (forma presente no sangue) e o de baixo peso molecular, encontrado no sangue e em vários tecidos (Habermann, 1963; Suzuki et al., 1967; Jacobsen, 1966). Em ratos, foi encontrado ainda o T-cininigênio, o qual é uma proteína envolvida em reações inflamatórias agudas (Okamoto & Greenbraum, 1983).

1.2. Calicreína Plasmática

A calicreína plasmática participa de eventos farmacológicos tais como regulação do tônus vascular, fibrinólise e inflamação. A calicreína plasmática é ativada a partir da pré-calicreína e pelos fatores XII (fator de Hageman) e XI (tromboplastina plasmática). Esta calicreína é codificada por um único gene. No fígado, a calicreína plasmática é secretada pelos hepatócitos como molécula inativa (pré-calicreína plasmática), que circula no plasma como um complexo heterodímero ligado ao cininogênio (Mandle et al., 1976). A molécula da pré-calicreína apresenta uma única cadeia glicoproteica ($pI = 8.9$) a qual existe em duas formas moleculares, de 85 e 88 kDa, ambas presentes no plasma humano (Mandle & Kaplan, 1977; Hojima et al., 1985; Veloso & Colman, 1992).

A calicreína plasmática libera bradicinina à partir do cininogênio de alto peso molecular, hidrolisando as ligações de Lys-Arg e Arg-Ser, originando assim o nonapeptídeo com arginina nos terminais NH_2 e $COOH$. O cininogênio de baixo peso molecular consiste em um substrato pobre para a calicreína plasmática, mas este pode ser clivado pela elastase do neutrófilo, liberando bradicinina (Sato & Nagasawa, 1988).

Na instalação e manutenção de diversas patologias, o sistema de calicreínas plasmáticas apresenta um papel relevante. Por exemplo, na necrose liquefativa provocada por proteínas microbianas em córneas de cobaias, ocorre inicialmente a ativação do fator de Hageman o que resulta em aumento de

permeabilidade vascular (edema) por liberação local de cininas (Kaminishi et al., 1990). É curioso que certas proteínas bacterianas prolongam o processo inflamatório por degradar inibidores naturais de serino proteases tais como α_2 antitripsina, α_2 macroglobulina, inibidor C_1 , α_2 antiplasmina e antitrombina III (Maeda & Molla, 1989). Estes inibidores degradam a caliceína recém formada no sangue. A caliceína plasmática tem sido implicada também em outras situações patológicas como edema angioneurótico hereditário, artrites e reações cutâneas dependentes de IgE (Kaplan et al., 1989).

1.3. Caliceínas Tissulares

As caliceínas tissulares presentes em pâncreas, glândulas salivares e rins foram primeiramente identificadas por Werle et al (1950) e, atualmente, sabe-se que são glicoproteínas ácidas com massa entre 24 a 45 kDa e ponto isoelétrico de 3.5 a 4.4 (Pisano et al., 1975; Fiedler et al., 1979). Em muitas espécies animais, as caliceínas tissulares representam a única classe de enzimas que hidrolizam uma arginina e uma metionina ligada ao cininogênio, liberando calidina. Em ratos e camundongos, esta enzima, à semelhança da tripsina, cliva a arginina e a lisina formando a bradicinina.

As caliceínas tissulares pertencem a uma família multigênica, sendo que os genes variam entre as diferentes espécies de mamíferos. Dessa forma, 24

genes foram identificados em camundongos (Richard et al., 1982), 20 em ratos (Ashley & Mac Donald, 1985), 3 em humanos (Fukushima et al., 1985) e aproximadamente 3 em Hamsters (Howles et al., 1984).

Nas últimas três décadas, a síntese e estocagem celular de caliceínas tissulares foram determinadas à partir de organelas subcelulares utilizando várias técnicas, tais como centrifugação diferencial, imunocitoquímica e hibridização *in situ*. A concepção de que as caliceínas tissulares podem ser armazenadas em organelas subcelulares teve origem à partir dos experimentos de Silbert et al (1955). De modo geral, as caliceínas tissulares foram localizadas em túbulos glândulares e ducto celular de glândulas submaxilares (Orstavik et al., 1976), ácinos e células β (Orstavik, 1980; Pinkus et al., 1983), ácinos de pâncreas com carcinoma (Berg et al., 1985), células conectoras tubulares dos rins (Tomita et al., 1981), mucosas (Schachter et al., 1983), epitélio de revestimento de glândulas e próstata (Schachter et al., 1978), glândulas traqueais (Bhoola et al., 1989) e mucosa nasal (Baumgarten et al., 1989), membrana da hipófise anterior (Vio et al., 1990), epidídimo, núcleos supraópticos paraventriculares e ventromediais do cérebro (Simson et al., 1985), retículo sarcoplasmático, glândulas de miócitos atriais de ratos (Xiong et al., 1990) e células CNT dos néfrons de rato, coelho e humanos (Figueroa et al., 1984). Recentemente, descobriu-se a presença de caliceína tissular em neutrófilos. Neste caso, a caliceína tissular cliva tanto o cininogênio de alto peso molecular (plasma) como o cininogênio de baixo peso molecular

(membranas celulares) indicando que as cininas possam estar envolvidas na diapedese de neutrófilos durante os processos inflamatórios (Figueroa et al., 1991). A estocagem intracelular das calicreínas tissulares varia de um tipo celular para outro e pode estar relacionada com a função da enzima em cada tecido. A calicreína tissular pode desempenhar uma única ou múltiplas funções, dependendo da célula e tecido em contexto. Contudo, o principal efeito das calicreínas tissulares consiste na liberação de cininas.

A importância funcional do sistema cinina-calicreína tissular na função reprodutiva em homens foi primeiramente descrita por Schill & Haberland (1974), quando estes observaram que a calicreína de pâncreas de porco estimulava a motilidade de espermatozóides humanos. Através da técnica de radioimunoensaio, a calicreína tissular foi identificada no sêmen de humanos e de suínos (Mann et al., 1980). Contudo, a próstata foi reconhecida como fonte mais provável desta enzima (Fink et al., 1985). A calicreína tissular foi posteriormente encontrada nas células de Sertoli dos testículos, epitélio do epidídimo e adenócitos da próstata (Kumamoto et al., 1989). A presença desta enzima nas células de sertoli e em túbulos semimíferos sugere a participação destas enzimas na espermatogênese. Estudos com pacientes que possuíam a fertilidade reduzida mostraram que a administração sistêmica de calicreína pancreática foi capaz de aumentar a motilidade e o número de espermatozóides. Acredita-se que este efeito ocorra por ação direta da calicreína tissular sobre o metabolismo do espermatozóide, assim como por

efeitos indiretos sobre a espermatogênese, melhorando as funções das células de Sertoli (Saitoh et al., 1987).

A calicreína tissular também está envolvida em processos patológicos tais como a pancreatite em humanos (Moiyoi et al., 1979). Além disso, esses pacientes apresentam simultaneamente hipotensão, choque e um decréscimo na circulação de cininogênio e pré-calicreína plasmática. As secreções nasais de pacientes com rinite alérgica contém cininogênio de alto e baixo peso molecular, bradisinina e calidina (Proud et al., 1983). A presença da calidina parece indicar a existência da calicreína tissular nas secreções nasais que, provavelmente seria originada à partir de neutrófilos (que migram para o sítio inflamado), ou seria secretada por glândulas traqueais. A calicreína tissular também é encontrada em fluido inflamado de articulações de pacientes com artrite reumatóide ou osteoartrite (Worthy et al., 1990).

1.4. Cininas

A bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), calidina (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) e metionil-lisil-bradicinina (Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) são peptídeos ativos capazes de evocar hipotensão, aumento de permeabilidade vascular, algesia, contração de diversos tipos de músculo liso (broncopulmonar, intestino e útero), aumentam a motilidade dos espermatozóides, ativam a fosfolipase A_2 , estimulam a osteoclase e participam de processos patológicos tais como artrite e asma (Sharma, 1992). Uma vez liberadas, as cininas são degradadas rapidamente por aminopeptidases (cininases) encontradas no sangue e em tecidos. As duas principais famílias de cininases são: KI e KII (Erdos, 1990). A KI é encontrada no plasma (KI-carboxipeptidase-N) e em membranas celulares (KI-carboxipeptidase-M), onde ambas removem o resíduo de Arg⁹ da cinina. A KII-ACE (enzima conversora de angiotensina) está ligada à membranas biológicas, especialmente a de células endoteliais, enquanto a KII-NEP (endopeptidase neutra) é encontrada nos rins, na microvilosidade intestinal, fibroblastos de pulmões e pele. Ambas hidrolisam a ligação Pró-Phe no terminal COOH.

A interação entre cininas e seu respectivo receptor pode levar à ativação de diversos sistemas de segundo mensageiros, liberação de produtos do ácido araquidônico (prostaciclina, tromboxano A_2) e cálcio intracelular.

Atualmente, foram identificados dois tipos de receptores para as cininas: B₁ e B₂. Os receptores do tipo B₁ são encontrados em músculo liso vascular (Bouthiler et al., 1987; Farmer et al., 1991) sendo provavelmente o responsável por eventos inflamatórios na artrite reumatóide, periodontites e osteomielites (Marceau et al., 1980; Couture et al., 1982). Os receptores B₂ estão presentes em útero de rata, gata e íleo de cobaia (Barabe et al., 1977). Em músculo liso vascular, os receptores B₂ são os responsáveis pelo aumento de permeabilidade vascular induzido por cininas (Schachter et al., 1987). Estes receptores estão também envolvidos em repostas patológicas como a dor (Whaley et al., 1987), bronconstrição (Jim et al., 1989) e hipotensão (Sharma., 1992). Evidências atuais indicam a existência de receptores do tipo B₃ e B₄. O receptor B₃ foi identificado em tecidos pulmonares (Farmer et al., 1989), em músculo liso longitudinal esofaríngeo onde promove a contração via liberação de prostaglandinas (Saha et al., 1990). O receptor do tipo B₄ foi identificado em músculo liso longitudinal esofaríngeo, mas a contração deste tecido parece não envolver prostaglandinas (Saha et al., 1990).

1.5. Veneno de *Phoneutria nigriventer*

A aranha armadeira *Phoneutria nigriventer* é encontrada na América do Sul, principalmente no Brasil, sendo a principal responsável pelos acidentes de araneísmo em humanos (Lucas, 1988). Os sinais de envenenamento em humanos e animais de experimentação incluem dor local intensa que se irradia para os membros adjacentes, choque neurogênico, distúrbios cardíacos (taquicardia e arritmias), edema pulmonar e priapismo (Schenberg & Pereira-Lima, 1971). Este veneno contém substâncias de natureza proteica capazes de ativar canais de sódio dependentes de voltagem em preparações de nervo frênico-diafragma de rato e aurículas isoladas de cobaias (Fontana & Vital-Brasil, 1985; Vital-Brasil et al., 1988). Além disso, o veneno de *Phoneutria nigriventer* promove contrações dose-dependentes de tecidos vasculares de coelho por um mecanismo ainda não identificado (Antunes et al., 1993; Marangoni et al., 1993). Recentemente, demonstramos que a injeção intradérmica do veneno de *Phoneutria nigriventer* em ratos e coelhos determina um aumento de permeabilidade vascular, efeito este potenciado por vasodilatadores tais como prostaglandina E_1 e CGRP (Antunes et al., 1992). O aumento de permeabilidade vascular na microcirculação cutânea de coelhos é decorrente da formação local de cininas, visto que o tratamento dos animais com antagonistas de receptores B_2 (Hoe 140) reduz a permeabilidade vascular ao passo que o tratamento com captopril (inibidor da enzima conversora de

angiotensina), potencia marcadamente a resposta edematogênica (Marangoni et al., 1993). O inibidor de proteases aprotinina (mas não o SBTI) também reduz o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno. Isto indica que o veneno de *Phoneutria nigriventer* ativa o sistema de calicreínas tissulares *in vivo* levando à formação local de cininas as quais promovem extravazamento de proteínas com consequente formação de edema (Marangoni et al., 1993). Resultados semelhantes foram observados em corpo cavernoso de coelho *in vitro*. Observamos que o veneno de *Phoneutria nigriventer* causa relaxamento destes tecidos pela ativação de calicreína tissular (Lopes-Martins et al., 1994). Na verdade, a ativação de sistema de calicreína tissular neste tecido resulta na geração local de cininas que indiretamente promovem liberação de óxido nítrico derivado do endotélio e, consequentemente, relaxamento. Estas conclusões foram baseadas em observações onde o captopril potencia a resposta relaxante do veneno ao passo que o Hoe-140 inibe o relaxamento. Além disso, a aprotinina (mas não o SBTI) e o inibidor de calicreína tissular KIZD-06 (P-F-pNH₂-F-S-V-Q-NH₂) reduziram marcadamente o efeito relaxante do veneno.

1.6. Inibidores de calicreínas tissulares

Conforme descrito acima, as calicreínas tissulares desempenham um papel importante em processos inflamatórios diversos. O "design" de novas drogas potencialmente capazes de inibir as calicreínas tem sido um grande desafio científico.

Os inibidores para calicreínas tissulares foram primeiramente descritos por Kraut et al. (1930) à partir de pulmões, pâncreas, glândulas submandibulares, nódulos linfáticos e rins bovinos (Kraut et al., 1930). A maioria destes inibidores consiste em proteínas com peso molecular de 5 a 20 kDa. Estes inibidores não são altamente específicos para estas enzimas visto que os mesmos inibem outras proteases como a tripsina (Werle & Vogel, 1973; Hochstrasse et al., 1974). Os inibidores de serino proteases podem ser agrupados de acordo com suas similaridades, tais como, centro ativo, mecanismo de ação, origem, características estruturais ou físico-químicas (Salvesen & Nagase, 1989). Estes inibidores podem ser do tipo Kunitz ou Serpinas. Os primeiros possuem peso molecular relativamente baixo e formam complexos fortes com diversas serino-proteasês; como exemplo deste grupo temos a aprotinina, isolada de pâncreas bovino, pulmão, ovário, coração, tireóide, hipófise e mucosa do rúmem (Chauvet & Acher, 1972). Apesar de não ser inibidor específico para as calicreínas tissulares, a utilização de aprotinina é

grande devido ao seu baixo peso molecular e alto poder inibitório. As serpinas possuem peso molecular elevado e formam complexos irreversíveis com as calicreínas; como exemplo deste grupo temos a calistatina que é um inibidor proteico endógeno isolado à partir de plasma humano, sendo provavelmente responsável pela regulação da atividade de calicreínas na circulação sanguínea e/ou nos tecidos (Chao et al., 1991, 1992).

2. OBJETIVOS

1. Investigar o efeito de calicreínas tissulares (calicreína pancreática de porco e urinária de coelho) e plasmática sobre a permeabilidade microvascular cutânea de coelhos *in vivo*;

2. Ensaiar novos inibidores de calicreínas tissulares sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela calicreína pancreática de porco e veneno de *Phoneutria nigriventer*, em coelhos.

3.1. Medida de permeabilidade vascular na microcirculação cutânea de coelhos

A permeabilidade microvascular cutânea foi estudada em coelhos albinos machos New Zeland (1.5 a 2.5 Kg), adquiridos na granja Criex, Mogi das Cruzes. O extravazamento de proteínas foi determinado em função do acúmulo local de albumina humana marcada com ^{125}I em sítios da pele dos animais (Williams, 1979; Brain & Williams, 1985). Os coelhos foram inicialmente anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 30-40 mg/Kg) através da veia marginal da orelha; quando necessário, doses de manutenção foram administradas. Em seguida, a ^{125}I albumina humana (2 $\mu\text{Ci/Kg}$) e azul de Evans (0.5 ml/Kg, 2.5% w/v) foram simultaneamente injetados pela via endovenosa. Os agentes edematogênicos (calicreína de pâncreas de porco, calicreína urinária de coelho, calicreína plasmática de coelho, bradicinina, histamina, veneno de *Phoneutria nigriventer* e fator ativador de plaquetas) foram preparados em salina estéril e injetados intradermicamente em volumes de 100 μl na pele dorsal dos animais previamente depilada. Cada dose de agonista foi injetada em seis diferentes sítios no dorso dos animais. Após 30 minutos, uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada através de punção cardíaca e o animal foi sacrificado injetando-se intravenosamente uma sobredose de Sagatal. A pele dorsal foi removida, os sítios injetados foram recortados (15 mm de diâmetro) e a

radioatividade presente em cada amostra de tecido cutâneo foi contada em contador gama. O edema formado de cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

3.2. Síntese dos inibidores de caliceína tissular (ESPs)

A síntese dos inibidores de caliceínas tissulares (ESPs) foi realizada pelo grupo dos Profs. Eline S. Prado & Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo. Os processos usados para síntese dos peptídeos cromogênicos e fluorogênicos foram descritos previamente por Chagas et al. (1991). A tabela 1 mostra os inibidores empregados neste estudo bem como o peso molecular e valores de K_i dos compostos. Em alguns experimentos, usamos um outro inibidor de caliceína tissular, o KIZD-06 (tabela 1), fornecido pelo Dr. J. Burton (Rational Drug Design, Boston University).

3.3. Ensaio de Farmacocinética

Neste ensaio foram utilizados coelhos machos New Zeland (1.5 à 2.5 Kg), anestesiados como descrito anteriormente. O inibidor ESP6 (ver tabela 1) foi injetado em bolo através da veia marginal de uma das orelhas. Amostras de sangue (10 ml) foram coletadas através da carótida (previamente canulada) nos tempos 0, 1, 5, 15, 30 (minutos), 1, 2, 4, 8 (horas) após o tempo de infusão do ESP6. Para cada amostra de sangue coletada, foi injetado volume igual de salina para manter a volemia do animal. As amostras foram centrifugadas para separação do plasma e dosagem dos compostos por HPLC.

3.4. Diálise do veneno de *Phoneutria nigriventer*

Visto que o veneno de *Phoneutria nigriventer* contém pequenas quantidades de substâncias vasoativas (histamina, serotonina) decidimos dialisar o veneno para excluirmos a participação destas substâncias no ensaio biológico. O veneno de *Phoneutria nigriventer* (3-4 ml de uma solução de 0.2%) foi dialisado contra 2 litros de salina (0.9%) por um período de 24 a 48 horas, à 4-6°C. A solução de diálise foi trocada quatro vezes durante este período. Foi retirada uma alíquota da solução do veneno antes de se iniciar a diálise para

comparação subsequente com material dialisado. O "cut off" da membrana de diálise foi de 10-12 kDa.

3.5. Purificação parcial da calicreína tissular de coelho

Coelhos machos adultos New Zealand foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 40 mg/Kg, i.v). Após a laparotomia, retirou-se a urina diretamente da bexiga. Esta foi acondicionada em frascos de vidro esterilizados e mantidos à 10°C até o momento da utilização do material.

Um "pool" de 500 ml de urina (proveniente de 25 coelhos) foi primeiramente dialisado contra água destilada, utilizando-se membrana de diálise com "cut off" de 20 kDa, à 4°C.

Alíquotas de 100 ml da urina dialisada foram então submetidas a uma cromatografia de troca iônica em DEAE - SEPHADEX G10 equilibrada com tampão Na_3PO_4 (0.05 M, pH=7.0) e condutividade 3mMho. Como tampões de eluição foram utilizadas soluções de Na_3PO_4 (0.05 M/ NaCl 0.3M; pH=7.0 e Na_3PO_4 0.05 M/ NaCl 0.6M; pH=0.7). Foram feitas dosagens de atividade do material não retido, eluído com 0.3 M NaCl e 0.6 M NaCl . A atividade da calicreína urinária de coelho só foi encontrada no material eluído com solução de NaCl 0.3 M. Desta forma, este material foi dialisado, liofilizado e

ressuspendido em solução de salina a 0.9% (10 ml), quando então foi submetido a cromatografia de afinidade em sistema FPLC-Superose 12. O material ativo que permaneceu ligado à coluna foi eluído, dialisado e novamente liofilizado.

3.6. Purificação parcial da calicreína plasmática de coelho

O sangue foi coletado através da veia marginal da orelha em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3.8% na proporção de 1:10. O sangue foi centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente. O plasma foi separado e congelado à 20 °C.

O plasma foi descongelado à 37 °C na presença de uma solução de inibidores contendo benzamidina (1 mM), EDTA (1 mM) e polybreno (50 µg/ml). A seguir, o plasma foi filtrado em gaze e o volume obtido mensurado. O plasma foi então dialisado contra tampão fosfato de sódio 0.016 M contendo 5 mM de NaCl, 0.02% de azida sódica, 1 mM de benzamidina, 1 mM de EDTA e 50 µg/ml de polybrene, em pH 8.2. O saco de diálise foi previamente tratada com ácido acético e posteriormente lavada intensamente em água destilada. O tampão de diálise foi trocado a cada 12 horas até que a condutividade atingisse valores próximos a 1.6 - 1.7 Mho. O plasma foi então novamente centrifugado para

precipitação de IgGs e seu volume final mensurado. A seguir, foi acrescentado a resina (DEAE - Sephadex) ao plasma. Essa mistura ficou sob agitação durante 2 horas antes da eluição, que foi realizada em volume igual ao da mistura plasma/resina. A solução obtida foi novamente colocada para dializar e então liofilizada.

A pró caliceína foi ativada incubando-se o plasma (50 µl) com tampão Tris (1300 µl) e sulfato de dextrana/acetona (50 µl), por 15 minutos à 0 °C.

Para a dosagem de caliceína plasmática, incubamos 900 µl da solução de substrato (N-Benzoil-Pro-Phe-Arg-paranitroanilina 0.6 mM) com 100 µl da mistura de ativação, incubados à 37 °C durante 10 minutos. A reação foi bloqueada com 150 µl de ácido acético à 30%. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm.

Este método foi adaptado para ser realizado em leitor de placas de Elisa. Para isto, utilizou-se a metodologia de ativação de plasma como descrito acima; porém, para a reação de hidrólise utilizou-se 10 µl de plasma ativado + 90 µl de substrato + 15 µl de ácido acético (para interromper a reação). A leitura foi realizada com filtro de 405 nm.

Curva Padrão de Paranitroanilina:

SDT Curve (μM)	Paranito 600 μM (μl)	Tris	HAC 30%
6.2	10	990	150
12.5	20	980	150
31.1	50	950	150
62.3	100	900	150
124.6	200	800	150

3.7. Medida da Pressão Arterial em Coelho

Coelhos machos (1.5 a 2.5 Kg) foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal, 30 - 40 mg/Kg). A carótida e a veia marginal da orelha foram canuladas para medida de pressão arterial e administração de drogas, respectivamente. A pressão arterial foi medida através de um transdutor de pressão (Ugo Basile, modelo PRC 21/3) conectado em canal polígrafo de dois canais (Ugo Basile). Os experimentos foram iniciados 15 minutos após a estabilização da pressão arterial que, geralmente permaneceu na faixa de 80 a 100 mmHg. O ESP6 foi administrado sob infusão contínua (0.22 ml/min) e as

demais drogas (acetilcolina e bradicinina) foram injetadas em bolus (100 μ l), lavando-se a cânula com 100 μ l de salina após cada administração.

3.9. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de DUNCAN. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4.1. Efeito de calicreínas plasmáticas e tissulares sobre a permeabilidade vascular

A figura 1 ilustra o efeito da injeção intradérmica de calicreína de pâncreas de porco (CPP; 100 ng/sítio, n=6), calicreína urinária de coelho (CUC; 1-100 ng/sítio, n=4) e calicreína plasmática de coelho (CPC; 10-100 ng/sítio, n=4) na ausência e na presença de prostaglandina E_1 (PGE_1 ; 0.1 nmol/sítio). Podemos observar que tanto a CPP quanto a calicreína urinária de coelho induziram extravasamento significativo de proteínas plasmáticas somente quando injetadas na presença de PGE_1 ($p < 0.05$). Por outro lado, a calicreína plasmática de coelho não causou extravasamento significativo de proteínas, mesmo na presença de PGE_1 . A partir desses resultados, passamos administrar a CPP (em virtude da facilidade de obtenção) e demais agonistas na presença de PGE_1 , no sentido de permitir uma resposta edematogênica significativa.

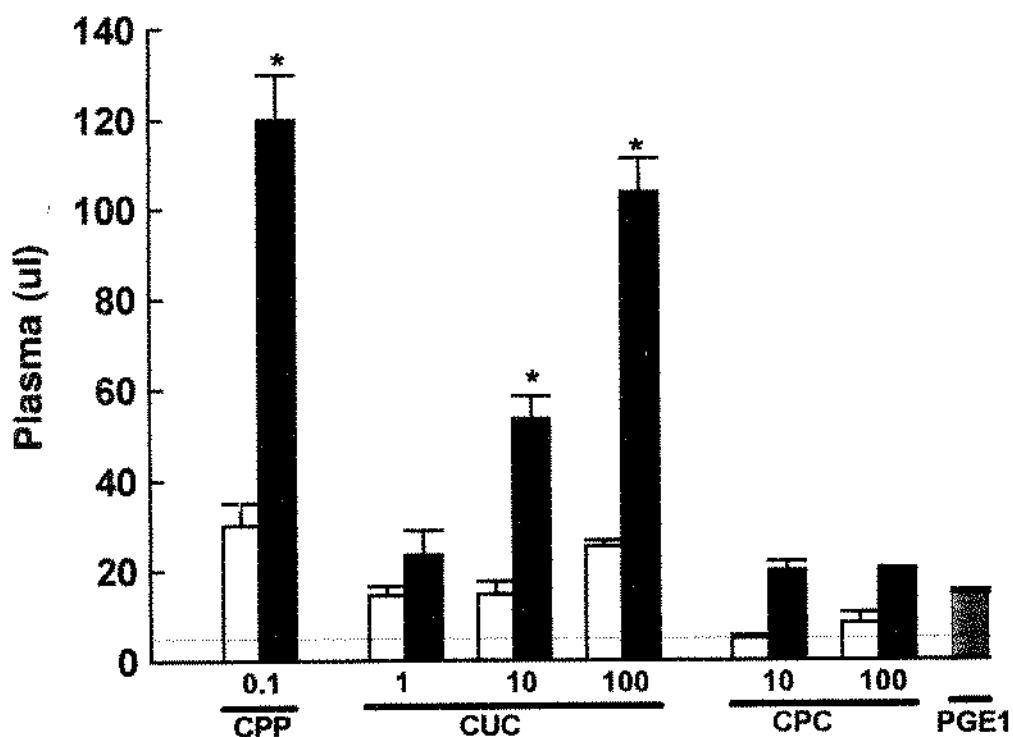


Figura 1. Aumento de permeabilidade vascular induzido por calicreínas em pele de coelhos. As colunas vazias e cheias correspondem aos compostos injetados na ausência e na presença de PGE_1 , respectivamente. A calicreína de pâncreas de porco (CPP) foi administrada na dose de $0.1 \mu\text{g/sítio}$, a calicreína urinária de coelho (CUC) foi administrada nas doses de 1, 10 e 100 ng/sítio, e a calicreína plasmática de coelho (CPC) nas doses de 10 e 100 ng/sítio. A linha tracejada representa o controle (sítios injetados com salina). As barras verticais correspondem ao erro padrão das médias para $n=7$. * $p<0.05$, em relação aos sítios injetados com PGE_1 individualmente.

4.2. Efeito de novos inibidores de calicreínas tissulares no aumento de permeabilidade vascular induzido pela calicreína pancreática de porco (CPP).

A tabela 1 mostra a composição em aminoácidos, peso molecular e valores de K_i para dez diferentes inibidores de calicreínas tissulares empregados neste estudo. Os resultados abaixo mostram o efeito dos inibidores de calicreínas tissulares quando co-injetados intradermicamente com os agentes edematogênicos (CPP, histamina e bradicinina). A injeção intradérmica do ESP5, ESP6, ESP8, ESP9 e ESP11 causou uma inibição dose-dependente do extravasamento de proteínas induzida pela CPP, quando administrada nas doses de 3-200 nmol/sítio (figura 2). Já os compostos ESP1, ESP3, ESP7 e ESP10 na dose de 200 nmol/sítio, não alteraram significativamente o extravasamento de plasma induzido pela CPP (figura 3). Na dose de 200 nmol/sítio, os compostos ESP5, ESP6 e ESP8 não apresentaram efeito significativo sobre o extravasamento de proteínas induzidos pela bradicinina (Bk; 0.1 µg/sítio) ou histamina (His; 3 nmol/sítio) (tabela 2). Os compostos ESP9 e ESP11 não foram testados com histamina (ou bradicinina) em virtude da baixa quantidade disponível. Conforme mostrado na tabela 3, o inibidor mais potente, em razão de seus valores de IC_{25} , foi o ESP6 seguido do ESP5, ESP8, ESP9 e ESP11.

Quando o ESP6 (200 nmol/sítio) foi administrado intradermicamente 30 minutos antes da CPP (0.1 µg/sítio) ou bradicinina (0.1 µg/sítio), verificamos que o mesmo causou uma redução significativa do edema induzido pela CPP sem, entretanto, modificar o extravasamento induzido pela bradicinina (figura 4).

TABELA 1

Sequência de aminoácidos, valores de K_i e peso molecular dos diferentes inibidores de calicreína tissular utilizados neste estudo

Sequência de Aminoácidos	K_i (μM)	Peso Molecular
Bz-F-F-R-P-R-NH ₂ (ESP1)	0.5	824
Bz-F-F-pNa(ESP3)	0.4	518
Bz-F-F-S-R-EDDnp(ESP5)	0.1	867
Pac-F-S-R-EDDnp(ESP6)	0.7	734
Bz-F-pNH ₂ -F-R-P-R-NH ₂ (ESP7)	1.1	838
Bz-F-F-A-P-R-NH ₂ (ESP8)	7.8	739
Pac-F-F-R-P-R-NH ₂ (ESP9)	0.3	824
Bz-F-F-S-P-R-NH ₂ (ESP10)	4.6	755
Bz-F-F-S-R-NH ₂ (ESP11)	0.3	658
P-F-p-NH ₂ -F-S-V-Q-NH ₂ (KIZD)	28.0	738

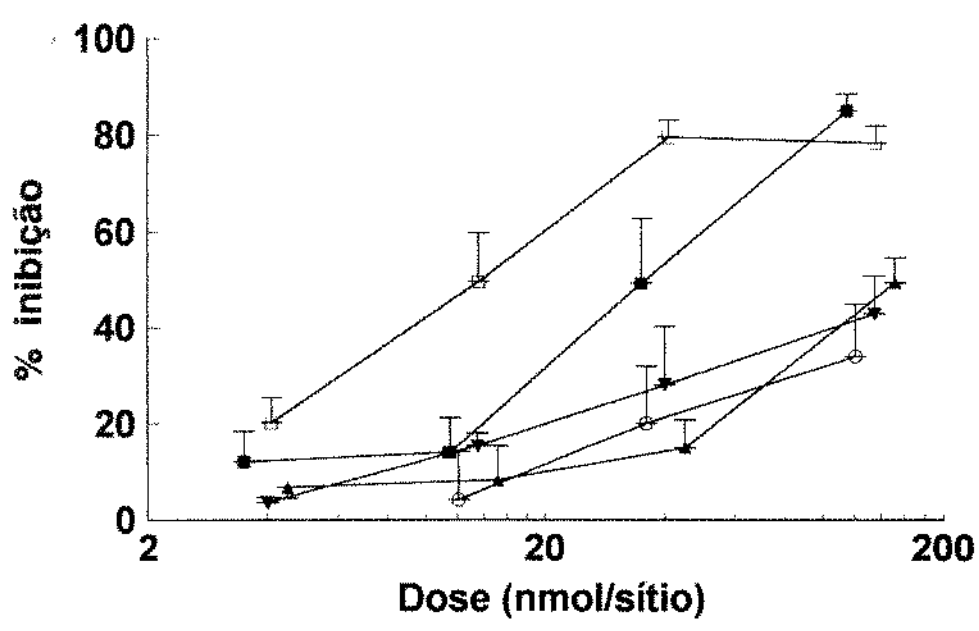


Figura 2. Efeito do ESP5 (■), ESP6 (□), ESP8 (▼), ESP9(▲) e ESP11 (○) sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela calicreína de pâncreas de porco. A calicreína de pâncreas de porco (0.1 µg/sítio) foi co-injetada com a prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=4-5).

TABELA 2

Efeito do ESP5, ESP6 e ESP8 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por bradicinina e histamina em presença de PGE_1 .

Tratamento	Bradicinina	Histamina
Controle	71.8 ± 15	nd
ESP5	67.2 ± 20	nd
Controle	67.3 ± 19	48.0 ± 16
ESP6	60.0 ± 12	35.6 ± 15
Controle	36.9 ± 8	48.0 ± 16
ESP8	33.0 ± 10	41.9 ± 19

Os inibidores ESP5, ESP6 e ESP8 foram utilizados nas doses de 200 nmol/sítio. A bradicinina, histamina e prostaglandina foram utilizadas nas doses de 0.1 μ g/sítio, 3 nmol/sítio e 0.1 nmol/sítio, respectivamente. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n=3-5). nd: não determinado.

TABELA 3

IC₂₅ dos inibidores de caliceína sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por caliceína pancreática de porco.

INIBIDORES	IC ₂₅ (nmol/sítio)
Pac-F-S-R-EDDnp (ESP6)	7.8
Bz-F-F-S-R-EDDnp (ESP5)	14.2
Bz-F-F-A-P-R-NH ₂ (ESP8)	25
Pac-F-F-R-P-R-NH ₂ (ESP9)	30
Bz-F-F-S-R-NH ₂ (ESP11)	50.4

A IC₂₅ foi definida como a dose do inibidor em estudo capaz de inibir em 25% o extravasamento de proteína plasmática induzido pela caliceína pancreática de porco (0.1 µg/sítio). n=4-5 animais.

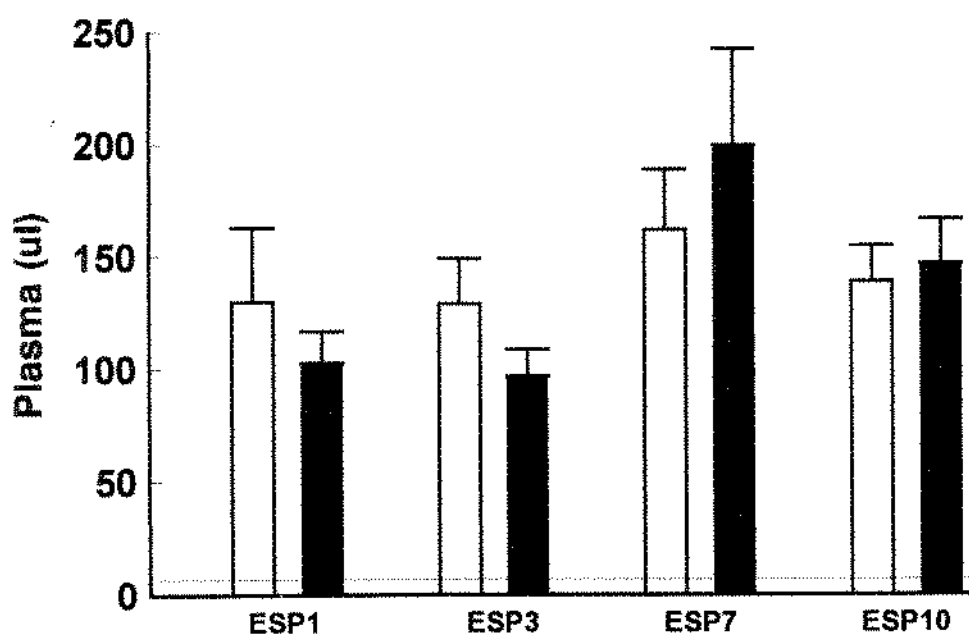


Figura 3. Efeito do ESP1, ESP3, ESP4, ESP7 e ESP10 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela caliceína de pâncreas de porco. Os inibidores foram utilizados nas doses de 200 nmol/sítio, os quais foram co-injetados com a caliceína pancreática de porco (0.1 μ g/sítio). As colunas vazias e cheias representam sítios controles e tratados, respectivamente. A linha tracejada horizontal representa os sítios injetados com salina. As barras verticais correspondem ao erro padrão das médias (n= 3-5).

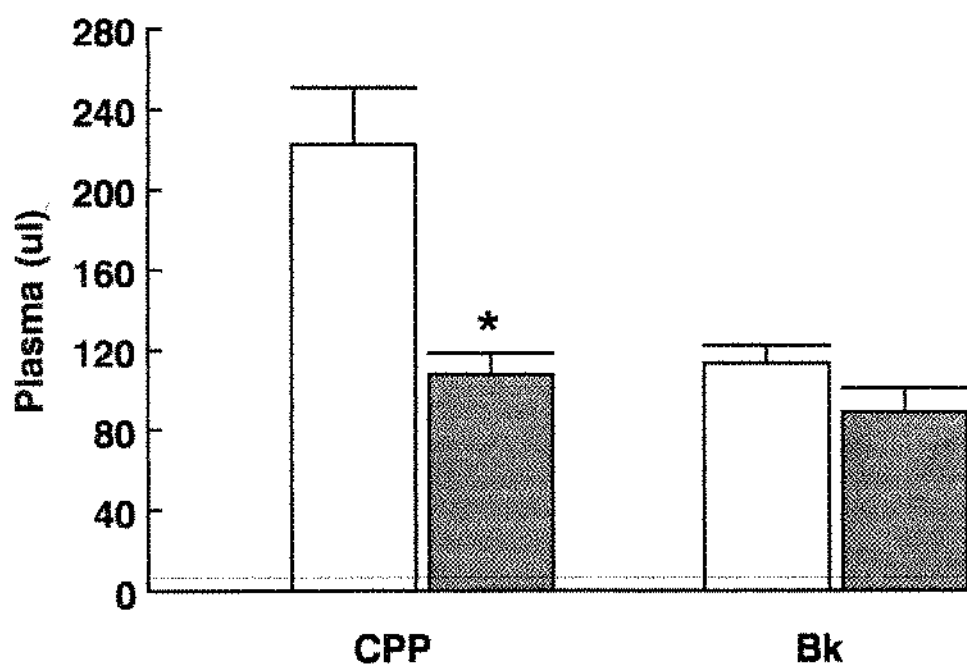


Figura 4. Efeito do pré-tratamento com ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular produzido pela calicreína de pâncreas de porco e bradicinina em pele de coelho. O ESP6 (200 nmol/sítio) foi injetado intradermicamente 30 minutos antes da calicreína pancreática de porco (CPP; 0.1 µg/sítio) e da bradicinina (Bk; 0.1 µg/sítio). As colunas abertas e hachureadas representam os sítios controles e tratados com o ESP6, respectivamente. Os resultados estão expressos como \pm o erro padrão das médias. * $p < 0.05$.

A injeção intradérmica de todos os inibidores utilizados neste estudo não causou extravasamento de proteínas quando injetados individualmente (200 nmol/sítio) e/ou quando co-injetados com PGE₁.

A seguir, investigamos o efeito do ESP6 administrado por via endovenosa, onde o mesmo foi administrado sob a forma de infusão contínua (0.2 ml/min) iniciada 15 minutos antes da injeção intradérmica dos agentes edematogênicos e terminada 30 minutos após a injeção destes agonistas. Os animais controles foram infundidos com salina estéril. Na concentração de 1.3 µmol/Kg, o ESP6 não alterou de forma significativa a resposta edematogênica induzida pela CPP, bradicinina e histamina (n=4; Figura 5). Entretanto na dose de 4 µmol/Kg, o ESP6 causou uma redução de $48 \pm 17\%$ no extravasamento de proteínas induzido pela CPP ($p < 0.05$, n=6). Curiosamente, nesta mesma concentração, o ESP6 reduziu de forma significativa ($p < 0.05$) o edema induzido pela bradicinina ($47 \pm 6\%$, n=6), histamina ($49 \pm 18\%$, n=6) e PAF ($52 \pm 17\%$, n=6). Estes resultados estão sumarizados na figura 5.

4.3. Cinética de desaparecimento do ESP6

O ESP6 foi infundido endovenosamente sob a forma de bolus na concentração de 4 $\mu\text{mol/Kg}$. A figura 6 mostra que aproximadamente 50% deste composto desaparece da circulação nos primeiros 15 minutos, enquanto que aos 30 minutos praticamente 100% do ESP6 já não existe mais na corrente circulatória.

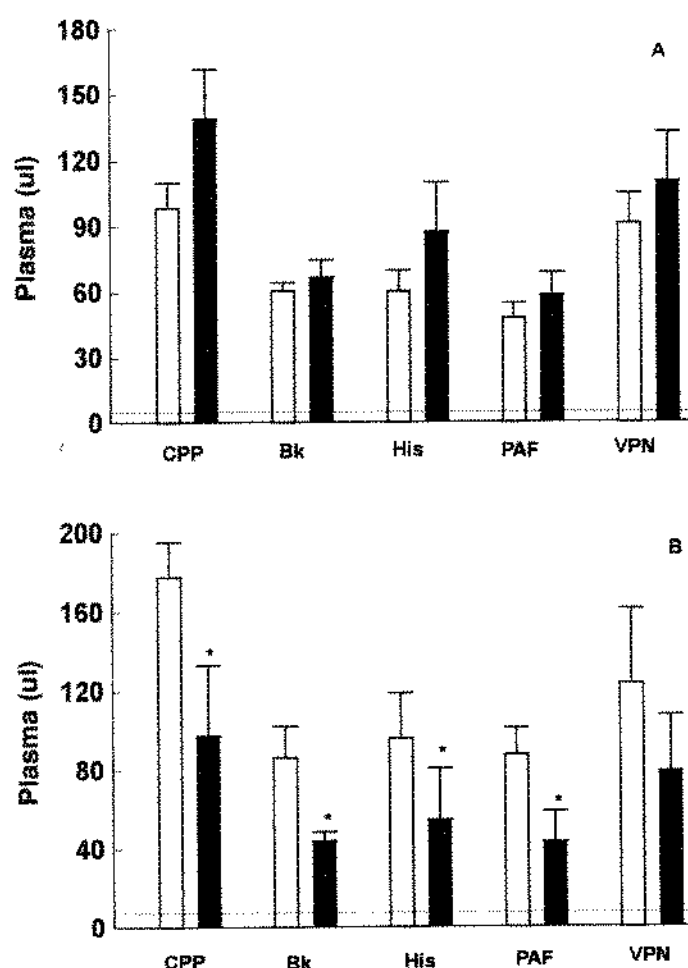


Figura 5. Efeito da administração endovenosa do ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por caliceína pancreática de porco, bradicinina, histamina, fator ativador de plaquetas e veneno de *Phoneutria nigriventer*. O ESP6 foi empregado nas doses de 1.3 (painel A) e 4 $\mu\text{mol/Kg}$ (painel B). A caliceína de pâncreas de porco (CPP, 0.1 $\mu\text{g/sítio}$), bradicinina (BK, 0.1 $\mu\text{g/sítio}$), histamina (His, 1 $\mu\text{g/sítio}$), fator ativador de plaquetas (PAF, 3 nmol/sítio) e veneno de *Phoneutria nigriventer* (VPN; 30 $\mu\text{g/sítio}$) foram co-injetados com a prostaglandina E_1 (0.1 nmol/sítio). As colunas vazias e cheias representam o grupo de animais controle e tratado, respectivamente. A linha tracejada corresponde aos sítios injetados com salina. As barras verticais correspondem às médias \pm erro padrão das médias ($n=6$). * $p<0.05$, em relação a seus controles.

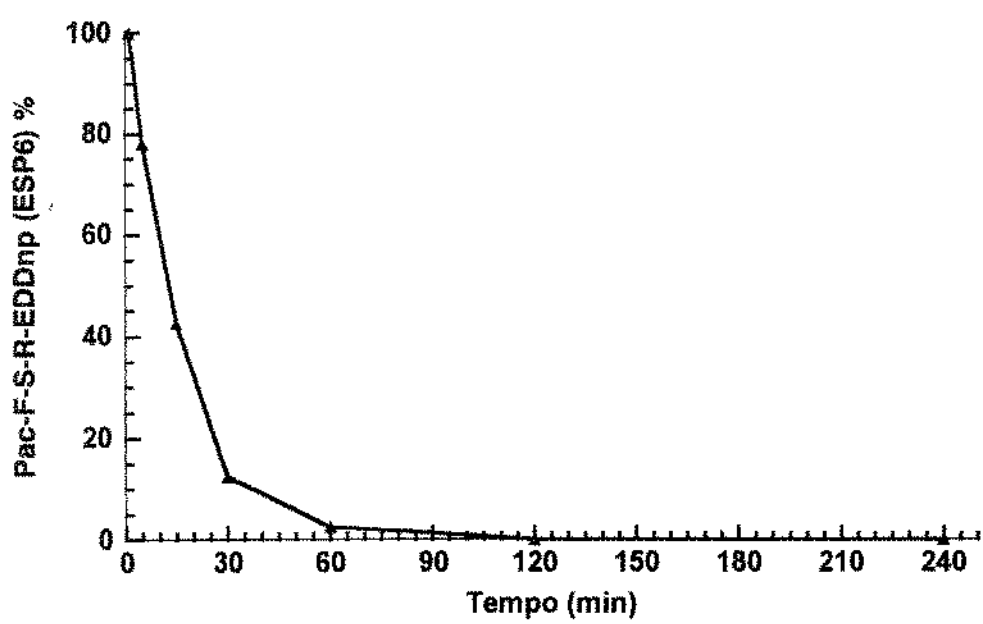


Figura 6. Tempo de degradação do ESP6. O eixo das ordenadas expressa a concentração do ESP6 (%) no plasma, e o eixo das abcissas o tempo após a administração.

4.4. Efeito do P-F-p-NH₂-F-S-V-Q-NH₂ (KIZD-6) sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela CPP

A figura 7 mostra que a injeção do KIZD-06 (200 nmol/sítio; n=7) causou inibição pequena, porém significativa, do extravasamento de proteínas induzido pela CPP (0.1 µg/sítio) e calicreína urinária de coelho (0.1 µg/sítio) sem, entretanto, modificar a resposta edematogênica induzida pela bradicinina (0.1 µg/sítio). Quando injetado individualmente em doses de até de 100 µg/sítio, o KIZD-06 não afetou a permeabilidade vascular. Ao contrário do tratamento local, o KIZD-06 não alterou a resposta edematogênica induzida pela CPP (0.1 µg/sítio), veneno de *Phoneutria nigriventer* (30 µg/sítio) e bradicinina (0.1 µg/sítio), quando injetado endovenosamente (5 mg/Kg; tabela 4).

4.5. Efeito do ESP5 e ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*

Conforme relatado anteriormente, o veneno de *Phoneutria nigriventer* aumenta a permeabilidade vascular em pele de coelho por um mecanismo dependente da ativação da calicreína tissular levando à geração local de cininas (Marangoni et al., 1993). No sentido de confirmar estas observações,

empregamos os inibidores ESP5 e ESP6 no edema cutâneo induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*. A Figura 8 mostra que o ESP5 (200 nmol/sítio) e ESP6 (200 nmol/sítio) promoveram uma pequena redução do extravasamento de plasma induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*. Há que se notar que a inibição observada sobre a resposta edematogênica do veneno foi significativamente menor do que aquela observada com a CPP. Contudo, a administração endovenosa do ESP6 (4 μ mol/Kg, n=6), sob a forma de infusão contínua (0.2 ml/min), não produziu inibição significativa do extravasamento de proteínas induzida pelo veneno (Figura 5).

4.6. Efeito do ESP6 sobre a Pressão Arterial de Coelhos

A infusão contínua do ESP6 (4 μ mol/Kg, 0.22 ml/min) durante 30 minutos, não alterou os valores de pressão arterial média observados antes e após a infusão deste composto (102 ± 7 mmHg e 97 ± 9 mmHg, valores de pressão arterial antes e após a infusão do ESP6, respectivamente; n=4). A infusão do ESP6 também não alterou significativamente a queda de pressão arterial induzida pela acetilcolina (1 e 3 μ g/Kg) e bradicinina (100 e 300 ng/Kg) (tabela 5).

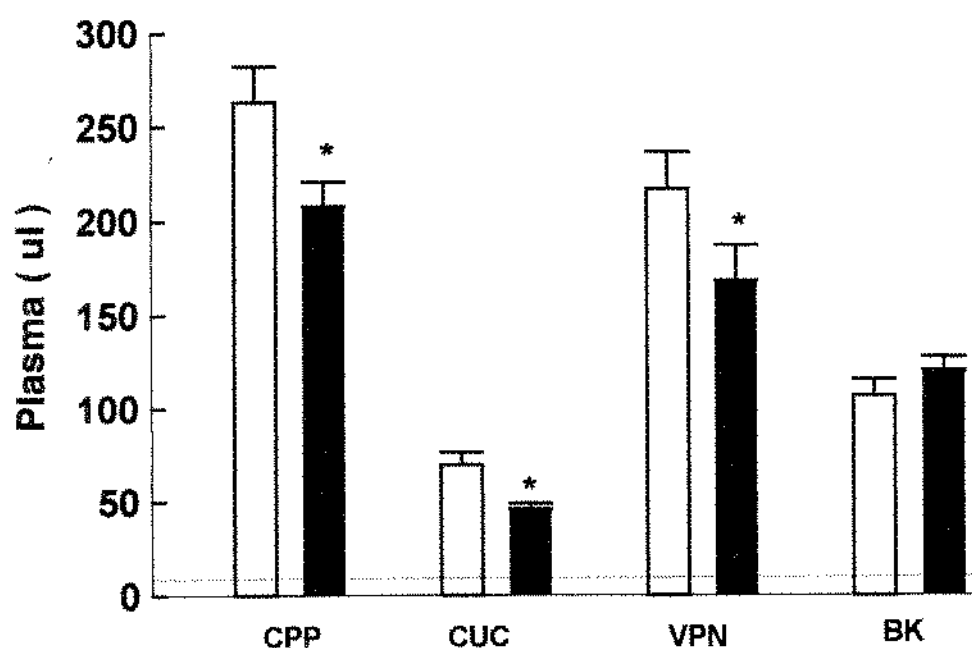


Figura 7. Efeito do KIZD-06 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por calicreína pancreática de porco, calicreína urinária de coelho, veneno de *Phoneutria nigriventer* e bradicinina. O ESP6 foi administrado na dose de 200 nmol/sítio. A calicreína pancreática de porco (CPP; 0.1 µg/sítio), calicreína urinária de coelho (CUC; 0.1 µg/sítio), veneno de *Phoneutria nigriventer* (VPN; 30 µg/sítio) e bradicinina (Bk; 0.1 µg/sítio) foram co-injetados com a prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio). As colunas vazias e cheias correspondem ao grupo de animais controles e tratados, respectivamente. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias para 7 experimentos. * $p < 0.05$ em relação aos respectivos controles.

TABELA 4

Efeito da infusão do KIZD-06 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela caliceína pancreática de porco, bradicinina e veneno de *Phoneutria nigriventer*.

PLASMA (µl)		
	Controle	Tratado
Salina	8.3 ± 1.5	14.5 ± 7.3
CPP	243.0 ± 16.0	316.2 ± 32.0
BK	85.0 ± 4.6	126.4 ± 13.0
VPN	202.3 ± 38.0	228.3 ± 23.0

O KIZD-06 foi empregado na dose de 6.8 µmol/Kg. A caliceína pancreática de porco (CPP; 0.1 µg/sítio), a bradicinina (Bk; 0.1 µg/sítio) e o veneno de *Phoneutria nigriventer* (VPN; 30 µg/sítio) foram co-injetados com a prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n=4).

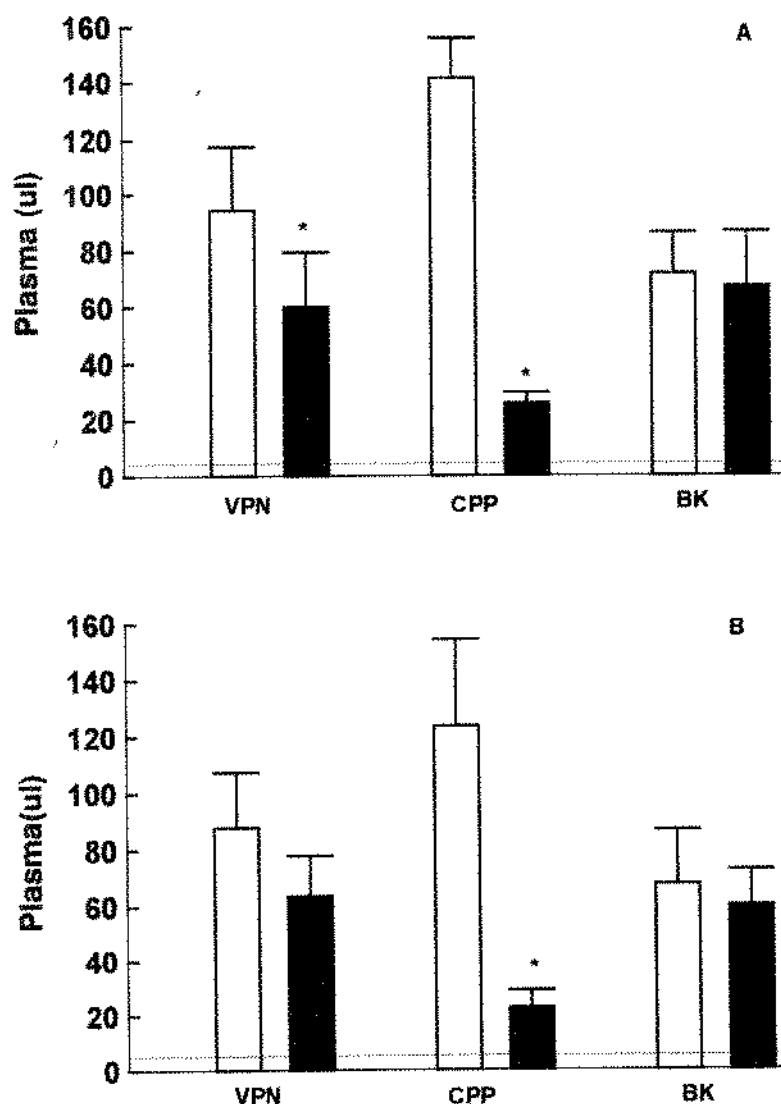


Figura 8. Efeito do ESP5 e ESP6 sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, caliceína pancreática de porco e bradicinina. O ESP5 e ESP6 foram administrados nas dose de 200 nmol/sítio. A caliceína pancreática de porco (CPP; 0.1 µg/sítio), a bradicinina (BK; 0.1 µg/sítio) e o veneno de *Phoneutria nigriventer* (VPN; 30 µg/sítio) foram co-injetados com a prostaglandina E₁ (0.1 nmol/sítio). As colunas vazias e cheias representam os sítios controles e tratados, respectivamente. As barras verticais correspondem ao erro padrão das médias (n=4). *P<0.05, em relação a seus respectivos controles.

TABELA 5
Efeito do ESP6 sobre a hipotensão induzida pela acetilcolina e
bradicinina em coelhos.

	Antes (mmHg)	Depois (mmHg)
Acetilcolina 1 $\mu\text{g/Kg}$	- 59	- 55
Acetilcolina 3 $\mu\text{g/Kg}$	- 71 \pm 1	- 67 \pm 11
Bradicinina 100 ng/Kg	- 49 \pm 5	- 44 \pm 8
Bradicinina 300 ng/Kg	- 58 \pm 2	- 54 \pm 4

O ESP6 foi infundido na dose de 4 $\mu\text{mol/Kg}$ durante 30 minutos. Os resultados estão expressos como \pm o erro padrão das médias (n=4).

5. DISCUSSÃO

.....

A reação inflamatória aguda é caracterizada por exudação de fluidos e proteínas plasmáticas levando à formação local de edema e consiste de eventos dependentes e independentes do influxo de leucócitos. As alterações vasculares são produzidas por diferentes mediadores inflamatórios os quais atuam em nível de vênulas pós-capilares para promoverem aumento de permeabilidade microvascular à macromoléculas. Os resultados apresentados neste estudo mostram que calicreínas tissulares tais como a pancreática e urinária de coelho são capazes de aumentar a permeabilidade vascular em pele de coelho causando extravazamento de proteínas plasmáticas com consequente formação local de edema. A exemplo de outros mediadores do processo inflamatório, o aumento de permeabilidade vascular induzido pelas calicreínas tissulares só foi observado quando tais agentes foram administrados na presença de um vasodilatador (PGE_1). De fato, estudos prévios têm mostrado que vasodilatadores tais como PGE_1 , PGE_2 , prostaciclina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) potenciam marcadamente o aumento de permeabilidade vascular induzido pela injeção intradérmica de mediadores inflamatórios incluindo a histamina, bradicinina (Spector & Willoughby, 1968), fator ativador de plaquetas (Morley et al., 1983; McGivern & Basran, 1984; Hwang et al., 1985), taquicíninas (Chahl, 1977; Lembeck & Holzer, 1979; Gamse & Saria, 1985) e leucotrienos (Peck et al., 1981; Ueno et al., 1981; Bray et al., 1981). A potenciação da resposta edematogênica causada pelos vasodilatadores tem sido explicada como

decorrente de sua ação dilatadora arteriolar levando a um aumento do fluxo sanguíneo local e, conseqüentemente, aumento na quantidade de plasma extravazado (Williams & Peck, 1977). Outros autores acreditam que, ao lado do efeito dilatador arteriolar, os vasodilatadores também atuam diretamente na membrana microvascular promovendo um aumento do número de "gaps" venulares, efeito este que não seria influenciado por alterações do fluxo sanguíneo (Joyner et al., 1979; Amelang et al., 1981; Pedroso-Mariani et al., 1995).

Curiosamente, a calicreína plasmática de coelho não promoveu aumento de permeabilidade vascular, mesmo na presença da PGE_1 . Isto parece sugerir que cininas geradas no compartimento extravascular (calidina) sejam moduladores da reação inflamatória (aumento de permeabilidade vascular e dor) mais importantes do que aquelas geradas no plasma (bradicinina). De qualquer forma, ao contrário da bradicinina, o papel fisiopatológico da calidina ainda não está completamente elucidado em razão do pouco conhecimento que se tem dos mecanismos de ativação do sistema da calicreína tissular. Estas enzimas são glicoproteínas ácidas (25-43 kDa) que agem perto de seu sítio de origem. No caso da calicreína pancreática humana, é conhecido que um fragmento de 24 aminoácidos é removido para formar a enzima ativa (Fukushima et al., 1985). Entretanto, a protease endógena responsável por esta reação ainda não foi identificada. A escassez de conhecimentos reflete em parte a ausência de inibidores eficientes *in vivo*. Nesse sentido, ensaiamos neste

estudo onze novos inibidores de calicreínas tissulares sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido pela calicreína pancreática de porco em pele de coelho *in vivo*.

Nossos resultados demonstraram que a administração local (subcutânea) dos compostos ESP5 (Bz-F-F-S-R-EDDnp), ESP6 (P^{ac}-F-S-R-EDDnp), ESP8 (Bz-F-F-A-P-R-NH₂), ESP9 (Pac-F-F-R-P-R-NH₂) e ESP11 (Bz-F-F-S-R-NH₂) inibiram de modo dose-dependente o extravazamento de proteínas induzido pela calicreína pancreática. Esta inibição foi específica para a calicreína tissular visto que os mesmos (ESP5, ESP6 e ESP8) não modificaram o edema induzido pela bradicinina e/ou histamina. O inibidor mais potente do extravazamento de proteínas plasmáticas foi o ESP6 apresentando uma IC₂₅ de 7.8 nmol/sítio. Curiosamente, parece não ter havido uma boa correlação entre os valores de K_i e aqueles de inibição de edema *in vivo*. Por exemplo, de todos os inibidores testados, o composto ESP5 apresentou o menor valor de K_i (K_i=0.1); entretanto, foi menos potente do que o ESP6 (K_i=0.7). Além disso, o composto ESP8 apresentou um dos maiores valores de K_i (K_i=7.8); entretanto, mostrou uma inibição significativa do edema (IC₂₅=25 nmol/sítio). Esta discrepância de resultados parece indicar que tais inibidores possam ser metabolizados *in vivo* para compostos mais (ou menos) eficientes. De fato, 15 minutos após a administração endovenosa do ESP6, 50% do composto já desapareceu da circulação ao passo que em 30 minutos, tal composto está praticamente ausente da corrente circulatória. Dessa forma, ensaios *in vivo* parecem ser

fundamentais para o estabelecimento de inibidores de caliceínas tissulares eficientes.

Outro aspecto interessante desse estudo foi a observação que a administração endovenosa do ESP6 determinou inibição "inespecífica" do aumento de permeabilidade vascular visto que, além de inibir o edema induzido caliceína pancreática, também inibiu o edema induzido por histamina, PAF e bradicinina. Ainda não conhecemos o mecanismo pelo qual o ESP6 promove tal inibição quando administrado endovenosamente embora podemos descartar a possibilidade que este efeito seja devido a uma queda na pressão arterial do animal em virtude do ESP6 não ter modificado a mesma. De qualquer forma, o ESP6 parece estar atuando em um mecanismo comum (pós-receptor) a todos os mediadores inflamatórios. O ESP6 poderia estar inibindo a contração das células endoteliais, passo fundamental para a abertura de junções entre as células endoteliais que permitem o efluxo de proteínas plasmáticas para o espaço intersticial. A isoprenalina (agonista β -adrenérgico) inibe o extravasamento de proteínas provavelmente por produzir um acúmulo de AMPc na célula endotelial (Persson & Svensjo, 1985; Grega, 1986).

Um outro aspecto que contribui para o pouco conhecimento sobre o sistema de caliceína tissular é a ausência de ferramentas farmacológicas capazes de ativá-lo. Nesse sentido, a descoberta que o veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* ativa o sistema de caliceína tissular em pele (Marangoni et al., 1993) e corpo cavernoso de coelho (Lopes-Martins et al., 1994) parece

colocar este veneno como uma ferramenta importante para estudos futuros. Nossos resultados demonstraram que o ESP5 e ESP6 também inibiram o aumento de permeabilidade vascular induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*, porém a inibição foi significativamente menor do que aquela exercida sobre a caliceína plasmática. Isto parece não ser surpreendente, especialmente se admitirmos que o veneno ativa a caliceína tissular endógena, diferente de induzirmos o edema injetando diretamente uma caliceína tissular exógena (caliceína pancreática de porco).

Os compostos ESP5 e ESP6 foram ambos potentes e seletivos inibidores de caliceínas tissulares quando administrados intradermicamente, o que torna tais compostos úteis em condições patológicas onde as caliceínas tissulares tenham papel relevante. Tais compostos podem também representar instrumentos farmacológicos importantes para a compreensão do sistema de caliceína tissular em diversas patologias como o processo inflamatório.

6. CONCLUSÕES

1. Calicreínas tissulares, mas não calicreína plasmática, promovem aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho *in vivo* acarretando a formação de edema local.

2. Dos dez inibidores de calicreínas tissulares ensaiados sobre o aumento de permeabilidade induzido pela calicreína pancreática, verificamos que o ESP6 foi o mais potente ($IC_{25} = 7.8$ nmol/sítio) seguido pelo ESP5 ($IC_{25} = 14$ nmol/sítio), ESP8 ($IC_{25} = 25$ nmol/sítio), ESP9 ($IC_{25} = 30$ nmol/sítio) e ESP11 ($IC_{25} = 50.4$ nmol/sítio). Inibição significativa da resposta edematogênica também foi obtida com o KIZD-06.

3. A administração endovenosa do ESP6 ($4 \mu\text{mol/Kg}$) determinou inibição significativa do edema de pele induzido pela calicreína pancreática (48 ± 17 % de inibição), bradicinina (47 ± 6 % de inibição), histamina (49 ± 18 % de inibição) e PAF (52 ± 17 % de inibição) sem, no entanto, modificar a pressão arterial dos animais.

4. Os compostos ESP5 e ESP6 também determinaram inibição significativa do edema induzido pelo veneno de *Phoneutria nigriventer*; entretanto, esta inibição foi significativamente menor do que aquela observada para a calicreína pancreática.

5. Do presente estudo, selecionamos inibidores de calicreínas tissulares (ESP5 e ESP6) bastante eficientes e que poderão ajudar futuramente a entender o papel fisiopatológico do sistema de calicreína tissular nos processos inflamatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amelang, E., C.M. Prasad, R.M. Raymond and G.J. Grega.: Interactions among inflammatory mediators on edema formation in the canine forelimb, *Circ. Res.* **49**: 298; 1981.

Antunes E, Marangoni RA, Brain SD and de Nucci G, *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom induces increased vascular permeability in rat and rabbit skin in vivo. *Toxicon* **30**: 1011-1016, 1992.

Antunes E, Marangoni RA, Brain SD and de Nucci G, Activation of tissue kallikrein-kininogen-kinin system by a component present in the *Phoneutria nigriventer* venom. *Toxicon* **31**: 1385-1391, 1993.

Ashley, P.L., and Mac Donald, R.J.: Tissue-specific expressions of kallikrein-related genes in the rat. *Biochemistry* **24**: 4520-4527; 1985.

Barabe J., Droulin J.N., Regoli D. and Park W.K. Receptors for bradykinin in intestine and uterine smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmac.* **96**: 920-926; 1977.

Baumgarten, C.R., Schwarting, R., and Kunkel, G.: Localization of glandular kallikrein in nasal mucosa of allergic and nonallergic individuals. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247B**: 523-528; 1989.

Brain, S.D. & Williams, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*: **86**, 855-860; 1985.

Berg, T., Johansen, L., Bergundhaugen, H., Hansen, L.J. Reddy, J.K., and Poulsen, K. Demonstration of kallikrein in a rat pancreatic acinar cell carcinoma. *Cancer Res.* **45**: 266-234; 1985.

Bhoola, K.D., and Ogle, C.W.: Subcellular localization of kallikrein, amylase, and acetylcholine in the submaxillary gland of the guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)*. **184**: 663-672, 1966.

Bhoola, K.D., Bewley, J., Crothers, D.M., Cingi, M.I., and Figueroa, C.D.: kinin receptors on epithelial cells and smooth muscle of the trachea. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247A**: 421-427; 1989.

Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K. Bioregulation of kinin: kallikreins, kininogens and Kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**: 4-80; 1992.

Bouthilier J., Deblois D. and Marceau F. Studies on the idution of pharmacological response to des-Arg⁹-bradykinin *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **92**: 257-264; 1987.

Bray, M.A., Cunningham, F.M., Ford-Hutchinson, A.W. & Smith, M.J.H.: Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* **72**: 483-486; 1981.

Chagas, J.R., Juliano, L., Prado, E.S. Intramolecular Quenched Fluorogenic Tetrapeptide Substrate for Tissue and Plasma Kallikreins. *Anal. Biochem.* **192**: 419-425; 1991.

Chahl, L.A.: Interactions of substance P with putative mediators of inflammation and ATP. *Eur. J. Pharmacol.*, **44**: 45-49.; 1977.

Chauvet, J. and Acher, R. FEBS Letters **23**, 317-320; 1972.

Couture R., Mizrahi J., Regoli R. and Devroede G. Peptides and the human colon: an in vitro pharmacological study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **59**: 957-970; 1982.

Erdos, E.G.: Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **15** (suppl. 6): 520-524; 1990.

Farme S.G., McMillan B.A., Mecker S.N and Burch R.M. Induction of vascular smooth muscle bradykinin B₁ receptors in vitro during antigen arthritis. *Agents Actions.* **34**: 191-193; 1991.

Farmer, S.G., Burch, R.M., Mecker, S.A. and Wilkins, D.I. Evidence for a pulmonary B₃ bradykinin receptor. *Molec. Pharmac.* **36**: 1-8; 1989.

Fiedler, F. Enzymology of glandular kallikreins. *In* Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, ed by E.G. Erdos, pp 103-161, Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979.

Figueroa, C.D., Caorsi, I., and Vio C.P.: Visualization of renal kallikrein in luminal and basolateral membranes. Effect of the tissue processing method. *J. Histochem. Cytochem.* **32**: 1238-1240; 1984.

Figueroa, C.D., Henderson, L.M., Colman, R.W., De La Cadena, R.A., Muller-Esterl, W., and Bhoola, K.D.: Immunoreactive L and H - kininogen in human neutrophils. *J. Physiol. (Lond.)* **425**: 65p, 1990.

Fink, E., Schill, W.B., Fiedler, F., Krassinig, F., Geiger, R. and Shimamoto, K. Tissue kallikrein in human seminal plasma is secreted by prostate gland. *Biol Chem. Hoppe Seyler*. **366**: 917-924; 1985.

Fontana, M.D., Vital Brasil, O.: Model of action of *Phoneutria nigriventer* venom at the isolated phrenic nerve diaphragm on the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **18(4)**: 557-559 ; 1985.

Fritz, H., Fiedler, F., Dietl, T., Warwas, M., Truscheit, E., Kolb, H.J., Mair, G., and Tschesche, H. On the relationships between pancreatic, submandibular and urinary kallikreins. *In* Kininogenases: kallikreinas, ed by G.L. Haberland, J.W. Rohen, and T. Suzuki, pp. 15-28, Schattauer, Stuttgart, New York; 1977.

Fukushima, D., Kitamura, N., and Nakanishi, S.: Nucleotide sequence of cloned cDNA for human pancreatic kallikrein. *Biochemistry*. **24**: 8037-8043;1985.

Gamse, R. & Saria, A.: Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **114**: 61-66.;1985.

Grega, G.J. Contractile elements in endothelial cells as potential targets for drug action. *Trends Pharmacological. Sci.* **7**: 452-457; 1986.

Habermann, E. Über pH-bedingte Modifikationen des Kininliefernden α -globulins (Kininogen) aus Rinderserum und das Molekulargewicht von Kininogen. *Biochem. Z.* **337**: 440-;1963.

Hochstrasse, K., Feuth, H., and Hochgesand, K. Proteinase inhibitors of the respiratory tract: studies on the structural relationship between acid-stable inhibitors present in the respiratory tract, plasma and urine. *In* Bayer Symposium V, Proteinase inhibitors, pp, 111-116, Springer-Verlag, Berlin; 1974.

Hojima, Y., Pierce, J.V., and Pisano, J.J.: Purification and characterization of multiple forms of human plasma prekallikrein. *J. Biol. Chem.* **260**: 400-406, 1985.

Howles, P.N., Dickinson, D.P., Di Caprio, L.L., Woodworth-Gutai, M., and Gross, K.W.: Use of a cDNA recombinant for the gamma-subunit of mouse nerve growth factor to localize members of this multigene family near the TAM-1 locus on chromosome 7. *Nucleic Acid Res.* **12**: 2791-2805; 1984.

Hwang, S-B.; Li, C-L.; Lam, M-H & Shen, T-Y.: Characterization of cutaneous vascular permeability induced by platelet-activating factor in guinea-pigs and rats and its inhibition by a platelet-activating factor receptor antagonist. *Lab. Invest.* **52**: 617-630; 1985.

Jacobsen, S. Separation of two different substrates for plasma kinin-forming enzymes. *Nature* **210**: 98-99; 1966.

Jin, L.S., Seeds, E., Page, C.P. and Schacheter, M. Inhibition of bradykinin-induced bronchoconstriction in the guinea-pig by a synthetic B₂ receptor antagonist. *Br. J. Pharmac.* **97**: 598-602; 1989.

Joyner, W.L., E. Svensjo and K.-E. Arfors.: Simultaneous measurements of macromolecular leakage and arteriolar blood flow as altered by PGE₁ and B₂-stimulation in the hamster cheek pouch, *Microvasc. Res.* **18**: 301- ; 1979.

Kamininishi, H., Tanaka, M., Cho, T., Maeda, H., and Hagihara, Y.: Activation of the plasma Kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* **58**: 2139-2143; 1990.

Kaplan, A.P., Reddigari, S., and Silverberg, M. Assessment of the plasma kinin-forming pathways in allergic diseases. *In* The kallikrein-kinin system in the Health and Disease, ed. by H. Fritz, I. Schmidt, and G. Dietze, pp. 143-153, Limback-Verlag, Braunschweig, Germany; 1989.

Kraut, H., Frey, E. K., and Werle, E. Über die Inaktiveringung des kallikreins. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **192**: 1-21; 1930.

Kumamoto, Y., Saito, S., Ito, N., Shimamoto, K., Imura, O. Localization of kallikrein in human male genital organ. *Advances Exp. Med Biol.* **247B**: 189-193; 1989.

Lembeck, F. & Holzer, P.: Substance P as a mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.*, **310**: 175-183; 1979.

Lopes-Martins, R.A.B., Antunes, E., Oliva, M.L., Sampaio, C., Burton, J., de Nucci, G. pharmacological Characterization of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by tissue kallikrein-kinin system. *Br. J. Pharmacol.* **113**: 81-86; 1994.

Lucas S, Spiders in Brazil. *Toxicon* **26**: 759-772; 1988.

Maeda, H., and Molla, A. Pathogenic potentials of bacterial proteases. *Clin. Chim. Acta* **185**: 357-368; 1989.

Mandle, R., Jr., and Kaplan, A.P. Hageman factor substances. II. Human plasma prekallikrein. Mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor dependent fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* **252**: 6097-6104; 1977.

Mandle, R.Jr., Colman, R.W., and Kaplan, A.P. Identification of pre kallikrein and HMW-kininogen as a circulating complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4179-4183; 1976.

Mann, K., Lipp, B., Grunst, J. Geiger, R., and Karl, H. J.: Determination of kallikrein by radioimmunoassay in human body fluids. *Agents Action* **10**: 329-334; 1980.

Marangoni, R.A., Antunes, E., Brain, S.D., de Nucci, G. Activation by *Phoneutria nigreventer* (armed spider) venom of tissue-kallikrein system in rabbit skin *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* **109**: 539-543; 1993.

Marceau F., Barabe J., St. Pierre S. and Regoli R. Kinin receptor in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmac.* **58**: 536-542; 1980.

Mariani-Pedroso, S.R., L. Bizeto, R. Zatz, E. Antunes and G. de Nucci.: Dissimilarity between prostaglandin E₁ and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin *in vivo*, *Prost. Leuk. and Essential Fatty Acids*. 1995.

Morley, J., Page, C.P. & Paul, W: Inflammatory actions of platelet-activating factor (Paf-acether) in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, **80**: 503-509; 1983.

McGivern, D.V. & Basran, G.S.: Synergism between platelet-activating factor (PAF-acether) and prostaglandin E₂ in man. *Eur. J. Pharmacol.* **102**: 183-185; 1984.

Schenberg S and Pereira-Lima FA, *Phoneutria nigriventer* venom. Pharmacology and biochemistry of its components. *In: Venomous Animals and their Venoms Vol.3.* Academic Press, New York, 279-297, 1971.

Movat, H.Z.: The plasma kallikrein system and interrelationship with other components of blood. *In Bradykinin, kallidin and kallikrein*, ed by E.G. Erdos, pp. 1-89, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 1979.

Okamoto, H., and Greenbaum, L.M.: Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**: 701-708, 1983.

Ole-Moiyoi, O., Seldin, D.C., Spragg, J., Pinkus, G. and Austen, K.F.: Sequential cleavage of pro-insulin by human pancreatic kallikrein and a human pancreatic kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3612-3616; 1979.

Orstavik, T.B., Nustad, K., and Brandtzaeg, P. Localization of glandular kallikrein in rat and man. *In Enzymatic Release of Vasoactive Peptides*, ed. by F. Gross and H. G. Vogel, pp. 137-149, Raven Press, New York; 1976.

Orstavik, T.B.: The kallikrein-Kinin system in exocrine organs. *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 881-889; 1980.

Peck, M.J., Piper, P.J. & Williams, T.J.: The effect of leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea-pig skin. *Prostaglandins*. **21**: 315-321; 1981.

Persson, C.G.A. & Svensjo, E.: Vascular responses and their suppression: drugs interfering with venular permeability. *In* The Pharmacological of inflammation, ed Bonta, I.L., Bray, M.A. & Parnham, M.J. pp.61-82. Amsterdam: Elsevier, 1985.

Pinkus, G.S., Maier, M., Seldin, D.C., Ole Møiyoi, O., Austen, K.F., and Spragg, J.: Immunohistochemical localization of glandular kallikrein in the endocrine and exocrine pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 1279-1288, 1983.

Pisano, J.J.: Chemistry and biology of the kallikrein-kinin sistem. *In* Proteases and Biological Control, ed. by E. Reich, D. B. Rifkin, and E. Shaw, pp. 199-222, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 1975.

Proud, D., Togias, A., Naclerio, R.M., Crush, S.B., Norman, P.S., and Lichtenstein, L.M.: Kinins are generated *in vivo* following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J. Clin. Invest.* **72**: 1678-1685; 1983.

Richards, R.I., Catanzaro, D.F., Mason, A.J., Morris, B.J., Baxter, J.D., and Shine, J. Mouse glandular kallikrein genes. *J. Biol. Chem.* **257**: 2758-2762; 1982.

Saha, J.K., Sengupta, J.N. and Goyal, R.K. Effect of bradykinin on opossum esophageal longitudinal smooth muscle: evidence for novel bradykinin receptors. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **252**: 1012-1020; 1990.

Saitoh, S., Kumamoto, Y., Shimamoto, K., and Limura, O. Kallikrein in the male reproductive system. *Arch. Androl.* **19**: 133-147; 1987.

Salvesen, G. and Nagase, H. *In* Proteolytic enzymes a practical approach. Beynon R.J and Bond, J.S., eds, pp 87-88. Oxford University Press, England; 1989.

Sato, F., and Nagasawa, S. Mechanism of kinin release from human low-molecular-mass-kininogen by the synergistic action of human plasma kallikrein and leucocyte elastase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**: 1009-1017; 1988.

Schachter, M., Maranda, B., and Moriwaki, C.: Localization of glandular kallikrein in the coagulation and submandibular glands of the guinea-pig. *J. Histochem. Cytochem.* **26**: 318-321; 1978.

Schachter, M., Peret, M.W., Billing, A.G., and Wheeler, G.D. Immunolocalization of the protease kallikrein in the colon. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 1255-1260; 1983.

Schachter, M., Uchida, Y., Longridge, D.J., Labedz, T., Whalley, E.T., Vavrek, R.J. and Stewart, J.M. New synthetic antagonists of bradykinin. *Br. J. Pharmac.* **92**: 851-855; 1987.

Schill, W.B. and Haberland, G.L. Kinin-induced enhancement of sperm motility. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**: 229-231; 1974.

Sharma J.N. Involvement of the kinin-forming system in the pathophysiology of rheumatoid inflammation. *Agents Actions* **38 (suppl. III)**: 343-361; 1992.

Silbert, G., Werle, E., Jung, G., and Maier, L. Intracellulare verteilung von Kallikrein und von bradykininogenin schweinepankreas. *Biochem. Z.* **326**: 420-423; 1955.

Simson, J.A.V., Dom, R., Chao, J., Woodley, C., and Margolius, H.S.: Immunocytochemical localization of tissue kallikrein in brain ventricular epithelium and hypothalamic cell bodies. *J. Histochem. Cytochem.* **33**: 951-953; 1985.

Spector, W.G. & Willoughby, D.A. (1968). The pharmacology of inflammation. The English Universities Press Ltd., by Butler & Tanner Ltd., Frome and London.

Suzuki, T., Iwanaga, S., Kato, T., Nagasawa, S., Kato, H., Yano, M., and Horiuchi, K.: Biochemical properties of kininogens and kinin-releasing enzymes. In International Symposium on Vasoactive Peptides: Bradykinin and related kinins, ed. by M. Rocha e Silva and H. A. Rothschild, pp. 27, Society for Brazilian Pharmacology Experimental Therapeutics, Sao Paulo, Brazil; 1967.

Tomita, K., Endou, H., and Sakai, F. Localisation of kallikrein-like activity along a single nephron in rabbits. *Pflügers Arch.* **389**: 91-95; 1981.

Ueno, A., Tanaka, K., Katori, M., Hayashi, M & Arai, Y.: Species differences in increased vascular permeability by synthetic leukotrienes C₄ and D₄. *Prostaglandins.* **21**: 637-648; 1981.

Veloso, D., and Colman, R.W. Western blot analysis of prekallikrein and its activation products in human plasma. *Thomb. Haemost.*, in press; 1992.

Vio, C.P., Roa, J.P., Silva, R., and Powers, C.A. Localization of immunoreactive glandular kallikrein in lactotrophs of the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* **51**: 10-14; 1990. Webster, M.E. Kallikrein in glandular tissue. In *Bradikinin, kallidin and kallikrein*, ed. by E. G. Erdos, pp 131-135, Springer-Verlag, Berlin; 1970.

Vital-Brazil O, Leite GB and Fontana MD, Modo de ação da peçonha da aranha armadeira, *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891), nas aurículas isoladas de cobaia. *Ciência Cultura* **40**: 181-185; 1988.

Werle, E. and Vogel, R. Über die freisetzung einer kallikrein-antigen substanz aus extrakten verschiedener organe. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 284-295, 257-261; 1973.

Werle, E. kallikrein, kallidin and related substances. In *Polypeptides Which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels*, ed. by Md. Schachter, pp. 199-209, Pergamon Press, Oxford, U. K.; 1960

Whalley, E.T., Nwator, I.A., Stewart, J.M. and Vavrek, R.J. Analysis of receptors of bradykinin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* **366**: 430-433; 1987.

Williams, T.J. & Morley, J.: Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature*, **246**: 215-217; 1973.

Williams, T.J. & Peck, M.J.: Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*. **270**: 530-532; 1977.

Williams, T. J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmac.* **65**: 517-524; 1979.

Worthy, K., Figueroa, C.D., Dieppe, P.A., and Bhoola, K.D. Kallikreins and kinins: mediators in inflammatory joint disease? *Int. J. Exp. Pathol.* **71**: 587-601; 1990.

Xiong, W., Chen, L., Woodley-Miller, C., Simson, J.V., and Chao, J.: Identification, purification and localization of tissue kallikrein in rat heart. *Biochem. J.* **267**: 639-646; 1990.

ABSTRACT

In this study we have investigated the effect of novel tissue kallikreins on the plasma protein exudation induced by either porcine pancreas kallikrein (PPK) or *Phoneutria nigriventer* spider venom in the rabbit skin *in vivo*. The tissue kallikrein inhibitors here described were synthesised based on analogues of peptide substrates for tissue kallikreins. The intradermal injection of PPK and rabbit urinary kallikrein, but not of rabbit plasma kallikrein, significantly increased the microvascular permeability leading to local oedema formation in the rabbit skin. At the dose of 3-200 nmol/site, the intradermal co-administration of the tissue kallikrein inhibitors Bz-F-F-S-R-EDDnp ($K_i=0.1$; ESP5), P^{AC} -F-S-R-EDDnp ($K_i=0.7$; ESP6), Bz-F-F-A-P-R-NH₂ ($K_i=7.8$; ESP8), P^{AC} -F-F-R-P-R-NH₂ ($K_i=0.3$; ESP9) and Bz-F-F-S-R-NH₂ ($K_i=0.3$; ESP11) dose-dependently inhibited the plasma protein exudation induced by PPK. The most potent compound was ESP6 ($IC_{25}= 7.8$ nmol/site) followed by ESP5 ($IC_{25}= 14.2$ nmol/site), ESP8 ($IC_{25}= 25$ nmol/site), ESP9 ($IC_{25}= 30$ nmol/site) and ESP11 ($IC_{25}= 50.4$ nmol/site). The compounds ESP5 (200 nmol/site) and ESP6 (200 nmol/site) also significantly inhibited the plasma protein exudation induced by *Phoneutria nigriventer* venom. The compounds Bz-F-F-R-P-R-NH₂ ($K_i=0.5$; ESP1), Bz-F-F-pNa ($K_i=0.4$; ESP3), Bz-F(NH₂)-F-R-P-R-NH₂ ($K_i=1.1$; ESP7) and Bz-F-F-S-P-R-NH₂ ($K_i=4.6$; ESP10) had no significant effect on the PPK-induced plasma protein exudation in doses

up to 200 nmol/site. ESP6 also inhibited the plasma protein exudation induced by either PPK when administered systemically (4 μ mol/Kg). This compound may constitute an useful tool to further investigate both the physiological and pathological role of tissue kallikreins.