

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Luiz Felipe Santana de Oliveira Almeida

**VASODILATAÇÃO E INFLAMAÇÃO MEDIADAS PELA BRADICININA E SEUS
METABÓLITOS ATIVOS: O PAPEL DA CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO
INTRACELULAR**

São Paulo
2023

Luiz Felipe Santana de Oliveira Almeida – SPGR017895

**VASODILATAÇÃO E INFLAMAÇÃO MEDIADAS PELA BRADICININA E SEUS
METABÓLITOS ATIVOS: O PAPEL DA CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO
INTRACELULAR**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Ana Yara Serrano Gomes, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Almeida, Luiz Felipe Santana de Oliveira

Vasodilatação e inflamação mediadas pela bradicinina e seus metabólitos ativos: o papel da concentração do cálcio intracelular / Luiz Felipe Santana de Oliveira Almeida. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

50 p.

Orientação de Ana Yara Serrano Gomes.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Bradicininina 2. Cálcio 3. Cininas 4. Inflamação 5. Vasodilatação I.
Gomes, Ana Yara Serrano II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.07

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, sendo o meu guia e protetor, a minha família, e especialmente aos meus orientadores, que acreditaram no meu potencial e foram fundamentais para que esta importante etapa fosse concluída.

AGRADECIMENTOS

Venho aqui agradecer primeiramente a Deus, o meu guia e protetor, sempre me abençoando e protegendo, mesmo não sendo merecedor muitas das vezes, mas nunca me abandonou e sempre me colocou em caminhos maravilhosos que eu nem sequer imaginava que poderia chegar. Sou grato por todas as bênçãos que me concede, pela sabedoria, e por colocar pessoas incríveis na minha vida ao longo desses anos de estudos.

Agradeço também a minha família, principalmente a minha mãe, dona Luziene, que sempre acreditou nos meus sonhos e me ajuda de todas as formas possíveis para que cada um dos meus objetivos vida possam serem alcançados, serei eternamente grato por tudo que fazes por mim.

Aos meus amigos, agradeço enormemente por acreditarem e apoiarem aos meus planos, pelas longas conversas, conselhos e principalmente pelo respeito e afeto demonstrado, sem vocês tudo seria mais difícil.

Agradeço a todos os meus professores ao longo desses anos estudos, os seus ensinamentos foram primordiais para o meu desenvolvimento, um trabalho como esse não seria possível sem o conhecimento que cada um de vocês me transmitiu.

À professora e Dra. Ana Yara Serrano Gomes, agradeço enormemente pela orientação neste trabalho, sem a sua ajuda não seria possível, obrigado pelos ensinamentos, conselhos e principalmente por acreditar no meu potencial.

Não poderia deixar de agradecer aos meus orientadores de iniciação científica, Dr. Ronaldo Carvalho Araújo, Dr. Alexandre Budu, e a toda equipe do laboratório de genética e metabolismo do exercício da UNIFESP, que me acolheram e acreditaram no meu potencial, sendo fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico.

RESUMO

A bradicinina (BK) é a molécula principal do sistema caliceína-cininas, um sistema hormonal envolvido em diversos processos fisiopatológicos, como inflamação, vasodilatação, nocicepção entre outras ações. As ações desse sistema são mediadas por moléculas (peptídeos) denominadas de cininas, que exercem suas ações biológicas e efeitos farmacológicos após interagirem com os receptores B2 e B1 de cininas. Essas ações das cininas são altamente dependentes de alteração da concentração do cálcio intracelular, visto que cálcio é o mineral mais abundante do organismo, sendo essencial para muitos eventos fisiológicos, incluindo a regulação e ativação de várias cinases dependentes de íons Ca^{2+} , além de fosfolipases, proteases e nucleases, assim, alterações na concentração intracelular deste íon causam importantes alterações para as células, conseqüentemente a homeostase do organismo. As cininas após ativarem seus receptores disparam cascata sinalização metabotrópica que produz segundos mensageiros, como o IP3, que são capazes de elevar rapidamente a concentração do cálcio intracelular. Este estudo teve como objetivo revisar como a bradicinina e seus metabólitos ativos promovem a vasodilatação e influenciam processos inflamatórios, sendo que diferentes eventos fisiopatológicos ocorridos durante a inflamação podem ser promovidos por esses peptídeos, inclusive a vasodilatação. Além disso, como alterações na concentração do cálcio intracelular influencia as ações desses peptídeos. Para alcançar este objetivo, uma revisão bibliográfica integrativa foi realizada a partir de artigos publicados em inglês, espanhol e português entre 1993 e 2023, encontrados nas bases de dados Pubmed, Scielo e Google Scholar, como também de livros e teses que abordam o assunto. Ao final deste trabalho pode -se concluir que as cininas ativas são capazes de promoverem a vasodilatação após interagirem com os receptores de cininas das células endoteliais, ativando a cascata de sinalização que promove o aumento da concentração do cálcio intracelular, resultando na ativação de enzimas que vão catalisar a produção e liberação de fatores vasodilatadores, como NO e PGI2. E essas cininas ativas, principalmente BK, são capazes de influenciar na progressão de quadros inflamatórios. Visto que esses peptídeos podem mediar os eventos comuns a inflamação aguda, como: vasodilatação, permeabilidade vascular, migração de leucócitos, aumento do transporte iônico, produção de NO e prostaglandinas. Além disso, em alguns tecidos, por exemplo, as vias aéreas as cininas podem mediar eventos que vão influenciar na cronicidade do quadro inflamatório, por meio da modulação de eventos, como: extravasamento microvascular, remodelação vascular e hiperalgesia crônica. E a concentração do cálcio intracelular influencia altamente a sinalização intracelular e ações biológicas mediadas pelas cininas ativas, visto que a intensidade e a duração dessa sinalização variam conforme a concentração do cálcio presente no citoplasma celular, além disso essa diferença na sinalização também influencia nos efeitos que cada receptor de cininas irá mediar.

Palavras-chave: bradicinina; cininas; vasodilatação; inflamação; cálcio.

ABSTRACT

Bradykinin (BK) is the main molecule of the kallikrein-kinin system, a hormonal system involved in several pathophysiological processes, such as inflammation, vasodilation, nociception, among other actions. The actions of this system are mediated by molecules (peptides) called kinins, which exert their biological actions and pharmacological effects after interacting with kinin receptors B2 and B1. These kinin actions are highly dependent on changes in the concentration of intracellular calcium, since calcium is the most abundant mineral in the body, being essential for many physiological events, including the regulation and activation of several kinases dependent on Ca²⁺ ions, as well as phospholipases, proteases and nucleases, thus, changes in the intracellular concentration of this ion cause important changes for cells. consequently the homeostasis of the organism. The kinins, after activating their receptors, trigger a metabotropic signaling cascade that produces second messengers, such as IP₃, which are capable of rapidly increasing the concentration of intracellular calcium. The objective of this study was to review how bradykinin and its active metabolites promote vasodilation and influence inflammatory processes, and different pathophysiological events occurring during inflammation can be promoted by these peptides, including vasodilation. In addition, changes in the concentration of intracellular calcium influence the actions of these peptides. To achieve this goal, an integrative literature review was carried out based on articles published in English, Spanish, and Portuguese between 1993 and 2023, found in the Pubmed, Scielo, and Google Scholar databases, as well as books and theses that address the subject. At the end of this work, it can be concluded that the active kinins are able to promote vasodilation after interacting with the kinin receptors of endothelial cells, activating the signaling cascade that promotes the increase of intracellular calcium concentration, resulting in the activation of enzymes that will catalyze the production and release of vasodilatory factors, such as NO and PGI₂. And these active kinins, especially BK, are capable of influencing the progression of inflammatory conditions. These peptides can mediate common events of acute inflammation, such as: vasodilation, vascular permeability, leukocyte migration, increased ion transport, production of NO and prostaglandins. In addition, in some tissues, for example, the airways, kinins can mediate events that will influence the chronicity of the inflammatory picture, through the modulation of events such as: microvascular extravasation, vascular remodeling and chronic hyperalgesia. And the concentration of intracellular calcium highly influences intracellular signaling and biological actions mediated by active kinins, since the intensity and duration of this signaling vary according to the concentration of calcium present in the cell cytoplasm, in addition to this difference in signaling also influences the effects that each kinin receptor will mediate.

Keywords: bradykinin; kinins; vasodilation; inflammation; calcium.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Os cininogênios são formados por splicing alternativo..... | 7 |
| Figura 2 – Vias de formação e degradação da BK..... | 8 |
| Figura 3 – Estrutura dos domínios do HMWK, destacando as suas funções e a localização da BK..... | 9 |
| Figura 4 – Esquema da cascata de coagulação, proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias..... | 10 |
| Figura 5 – Ativação do fator XII por contato leva a formação da BK..... | 10 |
| Figura 6 – Receptores acoplados à proteína G ou metabotrópicos..... | 12 |
| Figura 7 – Cascata de sinalização intracelular disparada pela ativação da proteína Gq..... | 14 |
| Figura 8 – Diferentes vias de sinalização metabotrópica são ativadas pelos receptores de cininas..... | 16 |
| Figura 9 – Dinâmica de sinalização de cálcio e homeostase..... | 17 |
| Figura 10 – Formação das cininas “nativas” e dos metabolitos ativos..... | 19 |
| Figura 11 – Produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas mediadas por cininas..... | 22 |
| Figura 12 – Fatores vasodilatadores originados do endotélio e a ação na musculatura lisa vascular..... | 23 |
| Figura 13 – Tipos de inflamação: aguda e crônica..... | 24 |

Figura 14 – Componentes de uma resposta inflamatória aguda e crônica: células e proteínas circulantes, células vasculares e as células e proteínas da matriz extracelular.....25

Figura 15 – Eventos mediados pela BK em processos inflamatórios.....26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Receptores de cininas e suas principais características.....13

Quadro 2 – Afinidade das cininas pelos receptores de cinininas em humano, camundongo e coelho.....20

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AC | Adenilato ciclase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AMP | Adenosina monofosfato |
| AMPC | Adenosina monofosfato cíclica |
| Arg | Arginina |
| BK | Bradicinina |
| BK 1-5 inicial | Bradicinina formada apenas por cinco aminoácidos restantes da sequência inicial |
| BK 1-7 inicial | Bradicinina formada apenas por sete aminoácidos restantes da sequência inicial |
| BDKRB1 | Gene codificante do receptor B1 de cininas |
| BDKRB2 | Gene codificante do receptor B2 de cininas |
| B ₁ R | Receptor B1 de cininas |
| B ₂ R | Receptor B2 de cininas |
| CPM | Carboxipeptidase M ou tecidual |
| CPN | Carboxipeptidase N ou plasmática |
| DAG | Diacilglicerol |
| DBK | Des-arg ⁹ -bradicinina; bradicinina com um aminoácido a menos |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| NOS _e | Óxido nítrico sintase endotelial |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> ou quinase regulada por sinal extracelular |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FDE | Fosfodiesterase |
| FLA ₂ | Fosfolipase A ₂ |
| FHDE | Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio |
| FLC β | Fosfolipase C Beta |
| FRDE | Fatores relaxantes derivados do endotélio Gly Glicina |
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclica |

| | |
|------------------|--|
| GTP | Guanosina trifosfato |
| HMWK | <i>High molecular weight kininogen</i> ou cininogênio de alto peso molecular |
| IC | Iniciação científica |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trifosfato |
| Ka | Constante de associação ou ionização |
| Kd | Constante de dissociação |
| Ki | Constante de inibição |
| KNG1 | Gene KNG1 ou gene codificante dos cininogênios |
| LMWK | <i>Low molecular weight kininogen</i> ou cininogênio de baixo peso molecular |
| Lys-BK | Bradicinina com dez aminoácidos ou bradicinina+Lisina |
| MAPKs | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> ou <i>Proteínas quinases ativadas por mitógenos</i> |
| NO | Óxido Nítrico |
| PGH ₂ | Prostaglandina H ₂ |
| PGI ₂ | Prostaciclina ou Prostagalndina I ₂ |
| Phe | Fenialanina |
| PIP ₂ | Fosfoinositol 4,5-bifosfato |
| PKA | Proteína quinase A |
| PKC | Proteína quinase C |
| PKG | Proteína quinase G |
| Pro | Prolina |
| RAEC | Células endoteliais de artérias de rato |
| RE | Reticulo endoplasmático |
| SCC | Sistema caliceína-cininas |
| Ser | Serina |
| TCC | Trabalho de conclusão de curso |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VOCs | Canais voltagem dependentes |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Arg ⁹ | arginina na posição nove |
| α | alfa |
| β | beta |
| Ca ²⁺ | íon cálcio |
| [Ca ²⁺] _i | concentração do cálcio intracelular |
| K ⁺ | íon potássio |
| Zn ²⁺ | íon zinco |
| γ | gama |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 4 |
| 2.1. Objetivo geral | |
| 2.2. Objetivos específicos | |
| 3. METODOLOGIA..... | 5 |
| 4. DESENVOLVIMENTO..... | 6 |
| 4.1 O sistema caliceína-cininas..... | 6 |
| 4.2 Formação e sinalização do sistema caliceína-cininas..... | 7 |
| 4.2.1 Vias de formação da bradicinina (BK)..... | 8 |
| 4.2.2 Mecanismos de sinalização intracelular das cininas..... | 11 |
| 4.2.3 Metabolização de cininas..... | 18 |
| 4.3 Vasodilatação..... | 20 |
| 4.4 Inflamação..... | 23 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 27 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 29 |

1 INTRODUÇÃO

O organismo apresenta diversos mecanismos regulatórios que vão responder à estímulos intrínsecos ou extrínsecos visando sempre manter a homeostase, dentre esses mecanismos temos a vasodilatação e a inflamação, que são fundamentais para manter o funcionamento adequado do organismo.

A Vasodilatação é o processo de relaxamento da musculatura lisa vascular, que tem como objetivos regular a temperatura corporal e a pressão arterial, sendo fundamental para a homeostase do organismo. Esse processo pode ser induzido pelo calor, por exemplo, em dias de altas temperaturas a exposição ao calor excessivo provoca vasodilatação que irá resultar em diminuição da pressão arterial e na perda de calor para o ambiente, por meio da sudorese. Além disso, existem algumas substâncias vasodilatadoras como: bradicinina, histamina e prostaglandinas (Su, J.B., et al. 2015).

A inflamação é uma resposta complexa do organismo, na qual se apresentam alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, cujo objetivo é responder a agentes agressores como: microrganismos, agentes químicos ou físicos, reações imunológicas, ou mesmo células danificadas, geralmente necróticas, além de tentar a reparação tecidual dos locais agredidos. Essa resposta causa vasodilatação e a permeabilidade vascular, recrutamento leucocitário e liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios nos locais agredidos, assim, a inflamação pode ser caracterizada por cinco sinais clássicos: dor, calor, rubor, inchaço (edema) e perda de função. Esses diversos eventos fisiopatológicos que acontecem no processo inflamatório vão depender do tipo de agressão que afetou organismo. Além disso, o processo inflamatório pode ser influenciado por alguns fatores, como a alimentação, fármacos e algumas substâncias, entre elas a bradicinina. Atualmente, é reconhecido que a inflamação está envolvida em várias doenças infecciosas ou não, sendo as doenças causadas por protozoários e bactérias, a osteoartrite, doenças do sistema cardiovascular, neuropatias, doenças pulmonares, esclerose múltipla e o câncer as mais destacáveis (Medzhitov, R. 2008).

A bradicinina (BK), um nonapeptídeo (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), é a molécula principal do sistema caliceína-cininas (SCC), um sistema hormonal envolvido em diversos processos fisiopatológicos, como inflamação (Sharma, J.N.

2005), vasodilatação (Schölkens, B.A. 1996), nocicepção (Calixto, J.B., et al. 2000) entre outras ações. As ações desse sistema são mediadas por peptídeos denominados de cininas, que exercem suas ações biológicas e efeitos farmacológicos após interagirem com os receptores B₂ e B₁ de cininas (B₂R e B₁R), sendo BK a principal delas. Além da BK, outras cininas também exercem ações importantes no SCC, como a calidina (Lys-BK) e os metabólitos ativos, des-arg⁹-bradicinina (DBK) e des-arg¹⁰-calidina que também atuam nos B₂R e B₁R.

As ações das cininas são de grande relevância na doença, pois diversos sinais de inflamação envolvem a mediação desses peptídeos (Couture, R., et al. 2001). As cininas podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor). Entre as principais ações fisiológicas da BK estão a sua participação nos mecanismos de controle do tônus vascular (Sharma, J.N. 2002), como a sua ação vasodilatadora arterial (Yamawaki, P., et al. 1994) que se deve principalmente à ativação de B₂R na membrana plasmática de células endoteliais (Busse, R., et al. 1996), seguida pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), que são potentes vasodilatadores. Além disso, em muitos tecidos, a BK leva a estimulação da fosfolipase A₂ (FLA₂), promovendo a liberação do ácido araquidônico (Catalioto, R.M., et al. 2015) que modificado dará origem à prostaglandinas e leucotrienos que são importantes mediadores da dor e inflamação.

Essas ações das cininas são altamente dependentes de alteração da concentração de cálcio intracelular, visto que cálcio é o mineral mais abundante do organismo, sendo essencial para muitos eventos fisiológicos, incluindo a regulação e ativação de várias cinases dependentes de íons Ca²⁺, além de fosfolipases, proteases e nucleases, assim, alterações na concentração intracelular deste íon causam importantes alterações para as células, conseqüentemente a homeostase do organismo. As cininas após ativarem seus receptores disparam cascata de sinalização metabotrópica (Marceau, F. et al. 2002) que produz segundos mensageiros, como o IP₃, que são capazes de elevar rapidamente a concentração intracelular desse íon. A partir da elevação dessa concentração algumas enzimas são ativadas, como a óxido nítrico sintase endotelial, que irá produzir o óxido nítrico (Busse, R. et al. 1995).

Visto que o sistema calicreína-cininas possui diversos papéis fisiopatológicos (Kashuba, E. et al. 2013), sendo a bradicinina a sua molécula central, mediando as

principais ações sobre o organismo, principalmente, via alterações na concentração do cálcio intracelular, ocasionadas pela sinalização intracelular disparada pelos receptores de cininas, como: a vasodilatação e a potencialização de processos inflamatórios. Assim, é de grande relevância entendermos cada vez mais como esse sistema pode afetar diferentes tipos celulares através da ação desse peptídeo e seus derivados, uma vez que podem mediar efeitos benéficos ou não para o organismo (Kaoki, M., et al. 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é abordar como a bradicinina e seus metabolitos ativos promovem a vasodilatação e influenciam processos inflamatórios, sendo que diferentes eventos fisiopatológicos ocorridos durante a inflamação podem ser promovidos por esses peptídeos, inclusive a vasodilatação. Além disso, como alterações na concentração do cálcio intracelular influencia as ações desses peptídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a importância e a formação do sistema caliceína-cininas no organismo;
- Detalhar a sinalização intracelular que as cininas disparam após estimulação dos seus receptores, e quais efeitos que podem ser promovidos ao final da cascata de sinalização;
- Discutir a importância do cálcio para o organismo, e qual a influência da sua concentração intracelular para a cascata de sinalização das cininas;
- Descrever como as cininas promovem a vasodilatação, e qual funcionalidade desse evento fisiopatológico durante processos inflamatórios;
- Apresentar os efeitos que as cininas podem desencadear em quadros inflamatórios, e como esses efeitos influenciam na progressão da inflamação;
- Definir o papel que a concentração intracelular de cálcio tem nas ações das cininas;

3 METODOLOGIA

Uma revisão bibliográfica integrativa foi realizada a partir de artigos publicados em inglês, espanhol e português entre 1993 e 2023, encontrados nas bases de dados Pubmed, Scielo e Google Scholar, como também de livros e teses que abordam o assunto, visto que o sistema calicreína-cininas já vem sendo estudado há bastante tempo, assim, toda informação é relevante desde as mais antigas, que ainda permanecem consolidadas. Para a pesquisa utilizaram-se as seguintes palavras-chave: bradicinina (*bradykinin*), cininas (*kinins*), receptores de cininas (*kinin receptors*), cininases (*kininases*), cálcio (*calcium*), inflamação (*inflammation*) e vasodilatação (*vasodilation*). Essas palavras chaves foram associadas para filtrar a seleção dos estudos, por exemplo: “formação de *cininas (training of kinines)*”; “*cininas e vasodilatação (kinins and vasodilation)*”; “*cininas e inflamação (kinins and inflammation)*”; “*cininas promovem aumento de cálcio (kinins promote calcium increase)*”.

Os critérios para seleção dos dados foram os seguintes:

- Os estudos foram analisados de forma descritiva conforme o componente ou função do sistema calicreína-cininas que eles abordam;
- Os dados extraídos destes estudos são os que permitem detalhar o sistema que estou abordando, por exemplo, as vias de formação das cininas, os receptores, cascatas de sinalizações, o influxo de cálcio e as ações fisiológicas das cininas em processos inflamatórios;
- Os dados foram extraídos na forma de citações, figuras, termos, além de trechos que serviram como inspiração para dissertação.
- A qualidade dos dados obtidos foi avaliada conforme a sua coerência, objetividade e relevância científica, junto ao *feedback* da orientadora deste trabalho;

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 O sistema caliceína-cininas (SCC)

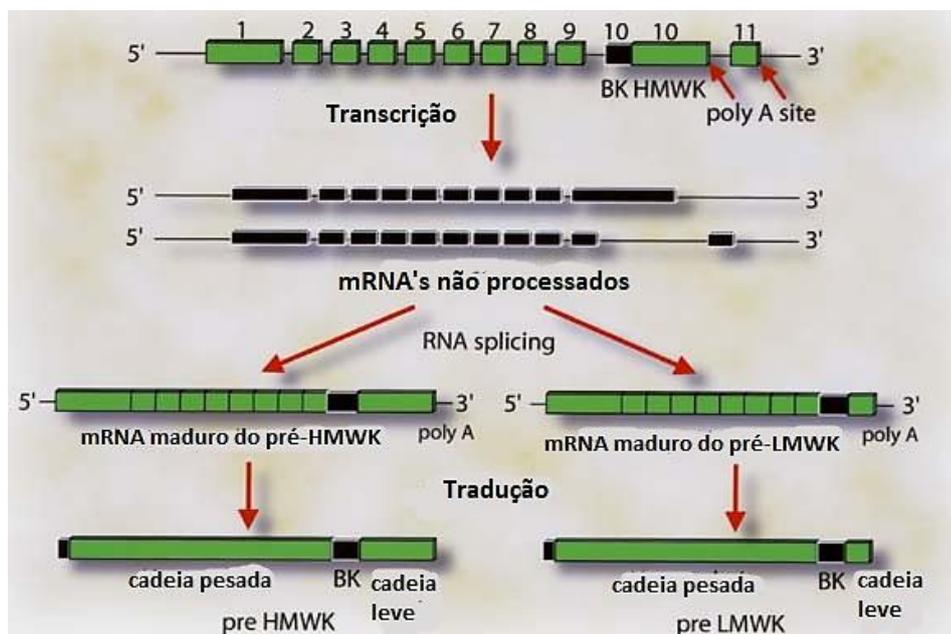
O sistema caliceína-cininas foi descoberto por J. E. Abelous e E. Bardier, em 1909, que demonstraram o efeito hipotensor da urina humana. A molécula central deste sistema é a bradicinina, um peptídeo potente vasodilatador, descoberto pelo farmacologista brasileiro Maurício Rocha e Silva, juntamente com Gastão Rosenfeld e o aluno de iniciação científica Wilson Texeira Beraldo, na década de 40 do século XX (Alves da Silva, T. 2022). Este sistema é multifuncional e possui múltiplos componentes que têm atraído a atenção de pesquisadores em diversas áreas há quase um século. A compreensão dos papéis fisiológicos e patológicos do SCC e das suas muitas interações íntimas com outros sistemas adaptativos e protetores do organismo tem aumentado significativamente a cada ano. Ao longo dos anos diversas etapas das pesquisas sobre o SCC foram conduzidas paralelamente aos estudos dos mecanismos moleculares reguladores em outros sistemas (Yarovaya, G.A., et al. 2015), como: o sistema da coagulação sanguínea, fibrinólise, complemento e sistema renina-angiotensina (Bekassy, Z., et al. 2022), bem como outros sistemas reguladores que empregam múltiplas moléculas sinalizadoras de naturezas diferentes.

O meu interesse por este sistema surgiu quando comecei a estagiar em laboratório de pesquisa básica, no qual trabalham muito com o SCC, e foi-me oferecida a oportunidade de iniciação científica (IC), visando pesquisar a sinalização intracelular mediada por cininas e produtos de degradação em células RAEC. Os meus primeiros experimentos nessa IC tinham o objetivo de verificar se os metabolitos inativos da bradicinina, BK 1-5 e BK 1-7, são capazes de modular o aumento da concentração do cálcio intracelular, assim como fazem as cininas ativas. E ao final dos primeiros experimentos, foi possível confirmar que esses peptídeos inativos não são capazes de modular o aumento do cálcio intracelular, assim comprovando a literatura já descrita há alguns anos. A partir disso surgiu o meu interesse no “papel da concentração do cálcio intracelular”, já que diversos efeitos promovidos pelas cininas são dependentes do cálcio. Essa IC me fez aprender como o SCC pode influenciar diversos sistemas do organismo, e conforme fui me aprofundando nos estudos sobre ele, decidi junto aos meus orientadores que seria interessante como TCC uma tese relacionando o papel do cálcio a alguns dos efeitos importantes mediados por esse sistema, como a vasodilatação e a potencialização de processos inflamatórios.

4.2 Formação e sinalização do sistema caliceína-cininas

O SCC é formado pelas cininas, peptídeos encontrados no sangue, e as biomoléculas farmacologicamente ativas deste sistema, sendo a bradicinina a principal delas, essas moléculas são capazes de mediar diversos eventos fisiopatológicos após sinalizarem via receptores de cininas. E são produzidas a partir de glicoproteínas encontradas no sangue da maioria dos vertebrados, os cininogênios de alto peso molecular (*HMWK*) e baixo peso molecular (*LMWK*), ambos produtos do mesmo gene (*KNG1*), sendo que essas isoformas diferentes são geradas devido ao *splicing* alternativo (Figura 1), um processo de clivagens que o mRNA sofre antes de se tornar maduro, gerando um embaralhamento da sequência codificante, assim diferentes combinações são formadas, permitindo a produção de diferentes proteínas a partir do mesmo gene. Esse gene *KNG1* possui 11 éxons (sequências de DNA que podem ser traduzidas em proteínas), nos quais os 9 primeiros codificam a cadeia pesada de ambos cininogênios; e o éxon 10 codifica a BK e a cadeia leve do *HMWK*, enquanto o éxon 11 codifica a cadeia leve do *LMWK* (Kaplan, A.P., et al. 2002). Esses dois cininogênios possuem a sequência de aminoácidos idêntica começando no N-terminal e continuando até 12 aminoácidos além da fração de bradicinina, mas diferem nos domínios C-terminais devido ao *splicing* alternativo. A partir disso, essas duas isoformas serão capazes de originar a bradicinina, mas por vias diferentes.

Figura 1 - Os cininogênios são formados por *splicing* alternativo.



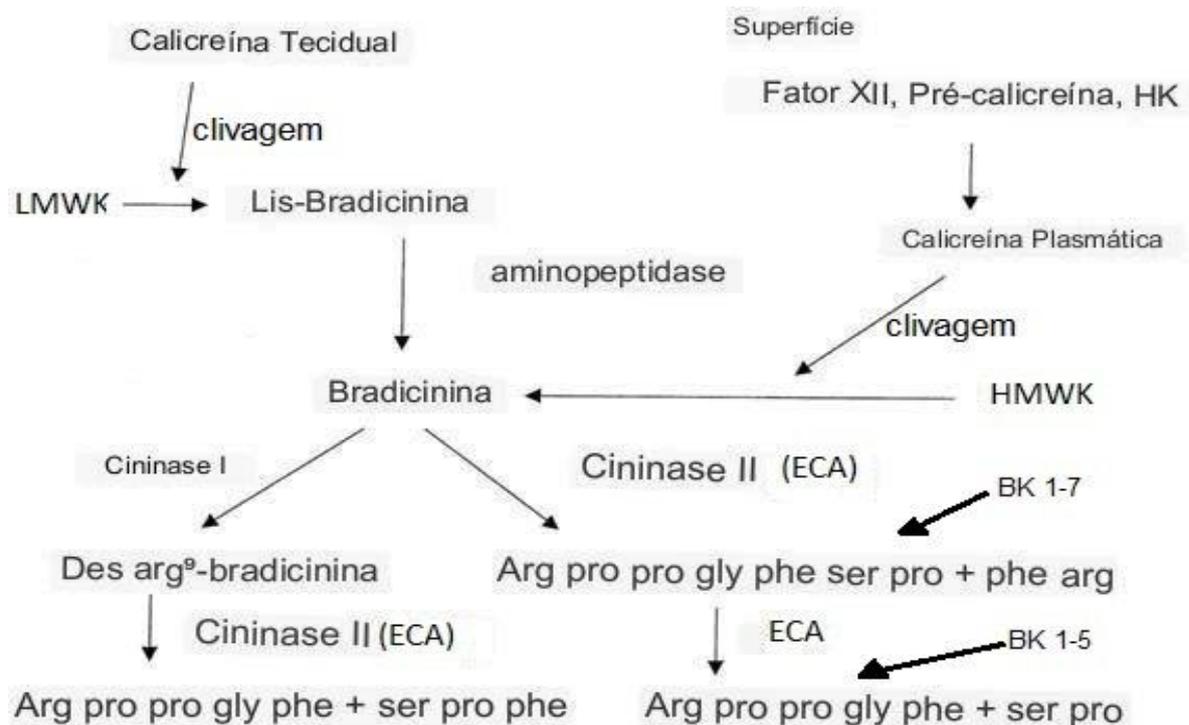
Fonte: Adaptado de Kaplan A.P., et al. (2002)

O gene KNG1 utiliza o *splicing* alternativo para gerar duas proteínas diferentes, são elas, o cininogênio de alto peso molecular (*HMWK*) e o cininogênio de baixo peso molecular (*LMWK*), essas duas proteínas irão formar bradicinina (BK), mas por vias diferentes.

4.2.1 Vias de formação da bradicinina (BK)

Visto que a bradicinina é a molécula central deste sistema, é de grande importância sabermos que existem duas vias conhecidas pelas quais ela pode ser formada (Figura 2), além dos componentes e características de cada via (Kaplan, A.P., et al. 2002). Sendo que a via mais conhecida e complexa para formação da BK envolve três componentes: o *HMWK*, a caliceína plasmática e o Fator XII da via intrínseca da coagulação. Enquanto a mais simples possui apenas 2 componentes: caliceína tecidual e o *LMWK*.

Figura 2 – Vias de formação e degradação da BK.



Fonte: Adaptado de Kaplan, A.P., et al. (2002)

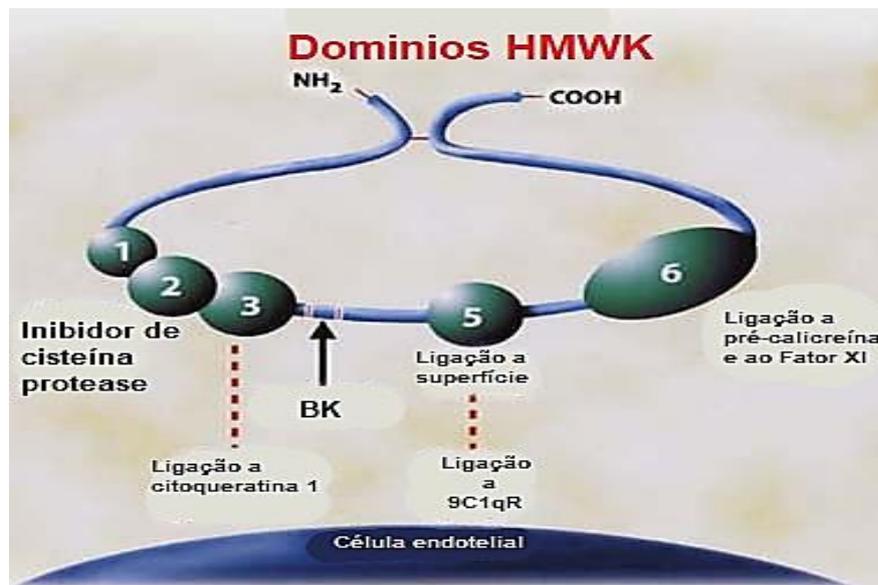
A bradicinina pode ser formada por duas vias diferentes; a clivagem que as caliceína (tecidual ou plasmática) exerce sobre o cininogênio (*HMWK* ou *LMWK*) libera a bradicinina. Além disso, após formada a bradicinina liberada no plasma pode ser metabolizada por cininases (tipo I ou II), que produzem metabolitos ativos (des-arg⁹-BK ou des-arg¹⁰-calidina) ou inativos (BK 1-5 e BK 1-7) da BK.

A caliceína plasmática e a caliceína tecidual são produtos gênicos separados com pouca homologia na sequência de aminoácidos, embora tenham funções relacionadas (isto é, clivagem de cininogênios). A caliceína tecidual tem maior

afinidade pelo *LMWK*, mas também é capaz de clivar *HMWK*, enquanto a calicreína plasmática cliva exclusivamente *HMWK*.

A via mais conhecida e complexa de formação da BK depende do *HMWK*, uma glicoproteína circulante no plasma que produz BK após sofrer ação da calicreína plasmática, que é liberada após ação do Fator XII da coagulação. Essa glicoproteína possui seis domínios (Ponzeck, M.B. 2021), sendo três deles na cadeia pesada e o quarto é o elo entre as cadeias leve e pesada, além de conter a BK, e os domínios cinco e seis estão na cadeia leve. Todos esses domínios são importantes, mas é justamente no quinto e sexto em que encontramos os sítios de ligações à superfície celular, pré-calicreína e o Fator XI da cascata de coagulação, respectivamente (Figura 3). Dessa forma, o *HMWK* é formado por domínios que são essenciais para ativar a cascata de coagulação intrínseca e o SCC.

Figura 3 – Estrutura dos domínios do *HMWK*, destacando as suas funções e a localização da BK.



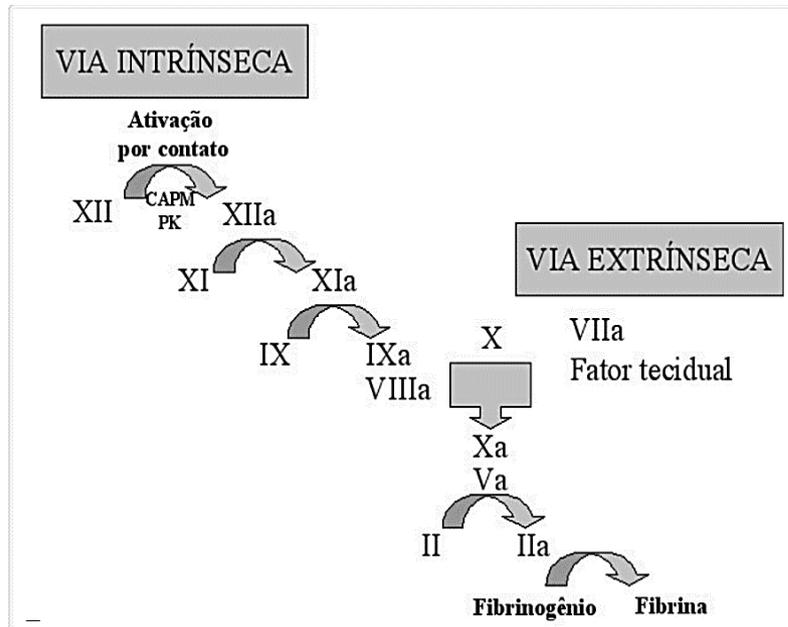
Fonte: Adaptado de Kaplan, A.P. et al. (2002)

Estrutura dos domínios do *HMWK* representando a localização da BK no quarto e a ligação a uma célula endotelial pelos domínios 3 e 5 interagindo com a citoqueratina 1 e ao receptor da proteína gC1q, respectivamente.

O fator XII da coagulação, também chamado de fator de Hageman, é uma proteína plasmática que ao entrar em contato com uma superfície carregada negativamente, como as células endoteliais, ocorre sua autoativação, formando o fator

XII ativado (XIIa). A partir disso, esse fator XIIa ativa a via intrínseca da coagulação e sistema complemento, além do SCC.

Figura 4 - Esquema da cascata de coagulação, proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias.

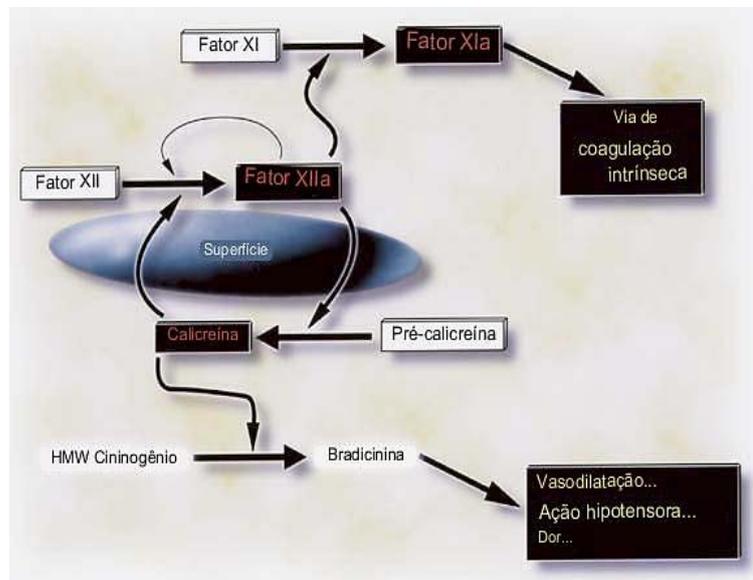


Fonte: Franco, R. F. (2001)

Esquema das vias intrínseca e extrínseca da coagulação, demonstrando o papel do fator XII na ativação dessas vias. CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína.

Esse fator XIIa ativa a pré-caliceína, que está complexada ao *HMWK*, liberando essa caliceína no plasma. A partir disso essa caliceína plasmática irá agir clivando o *HMWK*, liberando a BK e o *HMWK* ativo (*HKa*), assim o SCC é considerado ativo e capaz de atuar em diversos tecidos do organismo.

Figura 5 – Ativação do fator XII por contato leva a formação da BK.



Fonte: Adaptado de Kaplan, A.P., et al. (2002)

O fator XIIa irá ativar a pré-caliceína que está complexada ao *HMMK*, a partir disso essa mesma caliceína irá clivar esse cininogênio para liberar a bradicinina, que poderá atuar em diversos tecidos e provocar eventos fisiopatológicos, como a vasodilatação.

Diferente da plasmática, a caliceína tecidual é secretada por diversas células do corpo, porém, alguns tecidos a produzem em abundância, como: os tecidos glandulares (glândulas salivares, sudoríparas e o pâncreas exócrino), pulmão, rim, intestino e cérebro. Essa enzima possui um precursor, a pro-caliceína, que é convertida intracelularmente em caliceína tecidual. A caliceína tecidual quando secretada irá clivar o *LMWK* para produzir a calidina (Lys-BK), um peptídeo de 10 aminoácidos (lys-arg-pro-pro-gly-phe-ser-pro-phe-arg), que também possui ação biológica (Figura 2). A calidina, posteriormente, sofrerá uma clivagem por uma aminopeptidase plasmática na sua região Lys N-terminal, o que resulta no peptídeo de 9 aminoácidos, a bradicinina. Apesar de também possuir ação biológica, grande parte da calidina liberada será metabolizada para produzir a BK (Kaplan A.P., et al. 2002).

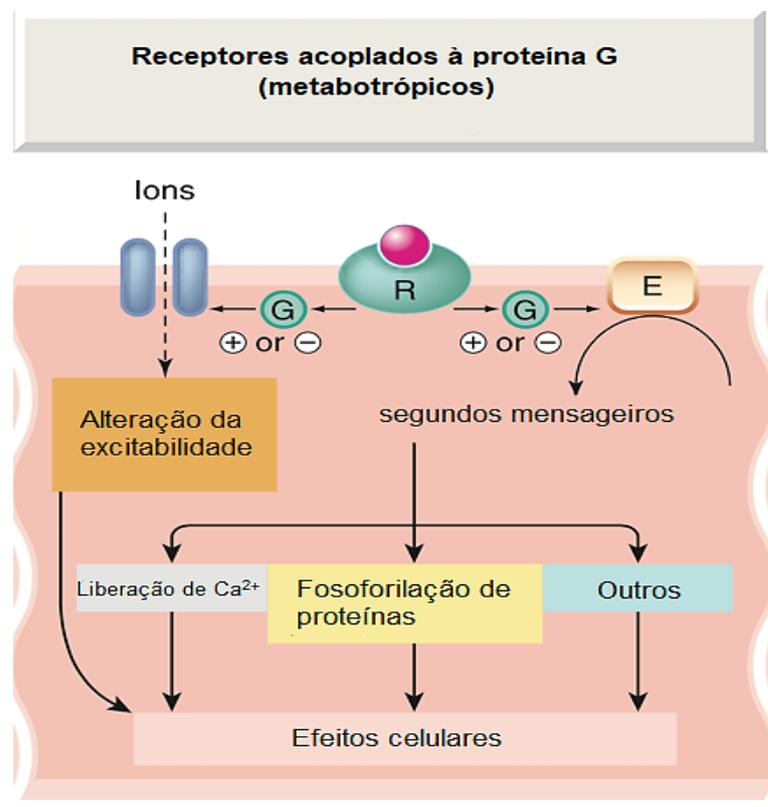
Dessa forma, a formação da BK é o ponto crucial para que o SCC seja ativado, mesmo que outras moléculas liberadas nesse processo também possuam ações biológicas. A BK após ser formada pode promover diversos efeitos ao organismo, mas também pode sofrer metabolização por algumas enzimas, que irão gerar outras cininas, sendo elas consideradas metabolitos ativos ou inativos da bradicinina.

4.2.2 Mecanismos de sinalização intracelular das cininas

As cininas promovem efeitos ao organismo a partir do momento que se ligam aos seus receptores específicos, e desencadeiam complexas cascatas de sinalizações intracelulares, que ao final resultarão em eventos fisiopatológicos, como a vasodilatação. O SCC possui dois receptores de cininas, B₂R e B₁R (Neubig, R.R., et al. 2003), codificados pelos genes *BDKRB1* e *BDKRB2*, respectivamente. O B₂R é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos, sendo que as células endoteliais o expressam abundantemente, onde está funcionalmente ligado à ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (NOSe). Enquanto o B₁R é expresso minimamente em condições normais, mas tem sua expressão induzida por inflamação, diabetes, lesão por isquemia/reperfusão (Alves da Silva, T. 2022).

Os receptores de cininas são do tipo metabotrópicos, acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares, e vão interagir com as proteínas $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha q}$ (Liao, J.K. et al. 1993), disparando as cascatas de sinalização. Além disso, o B_2R também pode interagir com proteína $G_{\alpha s}$ e as outras subunidades (β e γ) das proteínas G_i e G_q (Figura 7). Assim, esses receptores apresentam o padrão clássico de sinalização metabotrópica (Figura 6), no qual o ligante (cininas) se conecta ao receptor que dispara o sinal para a proteína G, que irá atuar sobre um efetor (enzimas) que atua sobre um substrato.

Figura 6 – Receptores acoplados à proteína G ou metabotrópicos



Fonte: Adaptado de Rang, H.P. et al. (2012)

Quando o ligante, por exemplo, a bradicinina se liga ao receptor de superfície, ele muda sua conformação ativando a proteína G (subunidade α é ativada) que irá atuar ativando uma enzima, e essa age sobre um substrato gerando produtos, os segundos mensageiros, que desencadearam na promoção efeitos celulares. Além disso, a proteína G pode atuar ativando canais iônicos que irão promover alterações na excitabilidade celular através do influxo de íons (+ ou -).

A sinalização por ambos os receptores se assemelha quanto as vias ativadas, mas diferem quanto à duração e à intensidade da concentração de cálcio intracelular, o que acarreta efeitos diferentes promovidos por cada receptor (Quadro 1).

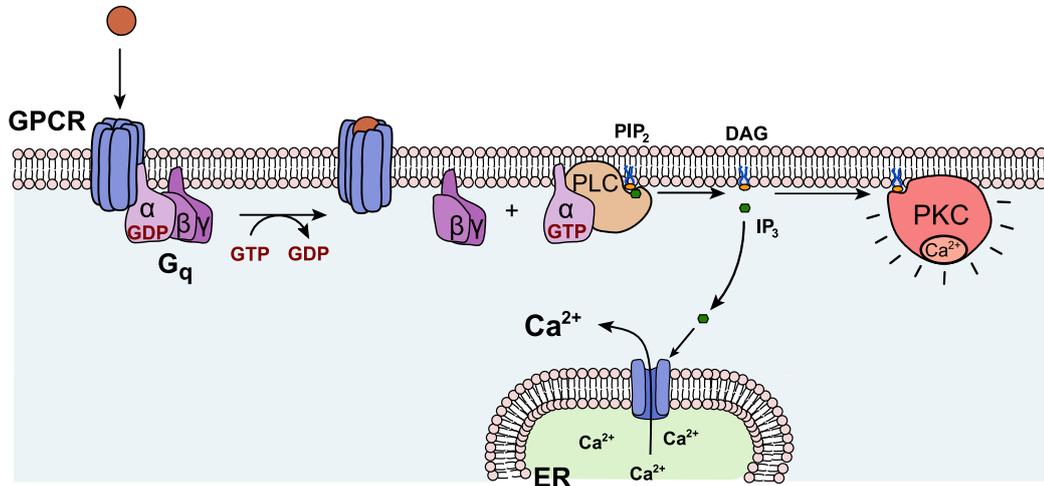
Quadro 1. Receptores de cininas e suas principais características.

| Receptor B1 | Receptor B2 |
|--|--|
| Expresso minimamente em condições normais, mas fortemente induzido em tecidos inflamados ou danificados. | Expresso constitutivamente na maioria dos tecidos normais. |
| Responde à des-arg ⁹ -BK e a des-arg ¹⁰ -calidina, mas não a própria bradicinina. | Responde seletivamente à bradicinina e calidina. |
| Desempenha papel significativo na inflamação e hiperalgesia. | Ativam FLA ₂ e FLC através da interação com diferentes proteínas G. Medeia a maioria dos efeitos fisiológicos relacionados às cininas. |

O B₂R sinaliza principalmente por Gαq (Guevara-Lora, I., et al. 2016), que por sua vez ativa a fosfolipase C Beta (FLCβ) resultando no aumento da concentração de cálcio intracelular. Visto que a ativação da FLCβ aumenta a produção de segundos mensageiros, já que essa enzima quando ativada atua hidrolisando o fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) na membrana plasmática, gerando o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃), que irão ativar a proteína quinase C (PKC) e estimular a liberação de Ca⁺² do retículo endoplasmático, respectivamente. O IP₃ produzido é liberado no citosol e atua nos receptores acoplados a canais iônicos (canais operados por ligante) no estoque de cálcio (retículo endoplasmático), deixando os canais de um estado não condutor para um estado condutor. Quando o canal está aberto o cálcio sai a favor do gradiente químico do retículo endoplasmático (RE) para o citosol, aumentando a concentração intracelular ([Ca²⁺]_i) desse íon (Figura 7). Esse aumento da [Ca²⁺]_i induz ativação de enzimas, por exemplo, a óxido nítrico sintase endotelial (NOSe) (Busse, R., et al. 1995) e a fosfolipase A₂ (FLA₂) (Tropea, M.M., et al. 1993), enzimas catalisadoras da produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂), respectivamente. Enquanto o DAG difunde-se pela membrana e ativa a PKC (Figura 7), que na presença de cálcio irá ativar proteínas específicas, como a proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a quinase regulada por sinal extracelular

(ERK), por meio da fosforilação dos resíduos de tirosina dessas proteínas (Dixon, B.S., et al.2002; Fleming, I., et al. 1995).

Figura 7. Cascata de sinalização intracelular disparada pela ativação da proteína Gq/11.



Fonte: Yikrazuul. (2010).

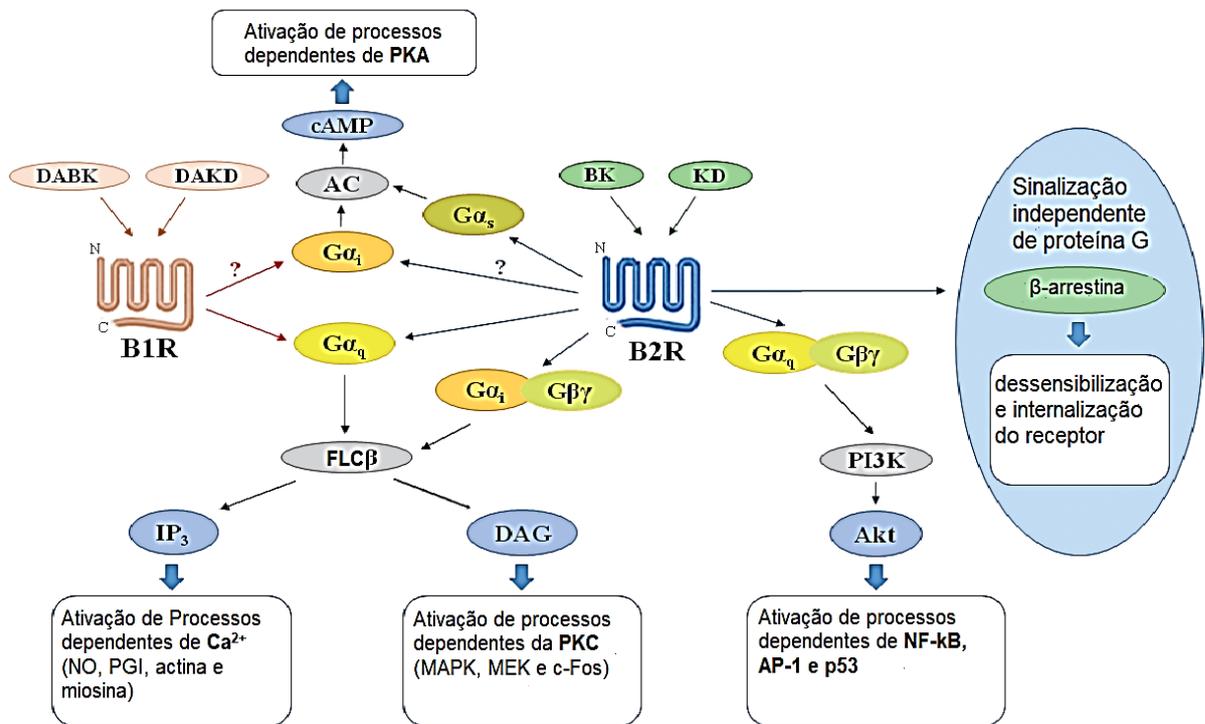
A transdução de sinal por B₁R é mais duradoura, tendo um aumento sustentado pela concentração intracelular de Ca²⁺, assim, dependendo também do influxo do cálcio extracelular. Enquanto o B₂R aumenta rapidamente a hidrólise do PIP₂, sem que haja uma dependência significativa do influxo de cálcio extracelular, o que leva a um breve aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ livre, assim, tendo uma B₂R sinalização mais rápida (Mathis, S.A., et al.1996).

Apesar de ambos os receptores sinalizarem principalmente por G_q, eles podem ativar outras proteínas G, como G_s e G_i, influenciando na ativação de outras vias (Figura 8). A proteína G_s quando é estimulada, a sua subunidade α estimula a enzima Adenilato ciclase (AC), que converte ATP em AMPc. O AMPc aumentado ativa a proteína cinase A (PKA), que é dependente de AMPc, e essa começa a fosforilar substratos. Enquanto a proteína G_i quando é estimulada, a sua subunidade α atua inibindo a AC, diminuindo a formação do produto e segundos mensageiros do ATP o AMPc. Além disso, atua estimulando a fosfodiesterase (FDE) que age sobre o AMPc hidrolisando-a ligação fosfodiesterase, convertendo-o em AMP, reduzindo os níveis de AMPc. Dependendo da célula em que a PKA foi ativada, ela poderá fosforilar substratos que contribuirão com o aumento ou redução da concentração de cálcio

intracelular. Para que o efeito intracelular promovido pela PKA seja revertido, é necessário a ativação de fosfatases.

A diferença na sinalização, possivelmente, deve-se ao B₂R ser mais suscetível a uma rápida dessensibilização após sua ativação, o que leva a internalização deste receptor, o que ocorre em menor grau com o B₁R (Faussner, A., et al. 1998). O B₂R é expresso constitutivamente na membrana celular, mas após a estimulação das cininas ele pode dessensibilizar com subsequente internalização, após a fosforilação do domínio C-terminal. Essa dessensibilização é regulada através de interações do receptor fosforilado com a β -arrestina (Marceau, F., et al., 2013) (Figura 8). Enquanto B₁R não consegue internalizar completamente em resposta aos agonistas, em parte devido à ausência de locais de fosforilação no domínio C-terminal. Assim, a transdução de sinal lenta e prolongada deste receptor pode ser atribuída à sua incapacidade de internalização (Enquist, J., et al. 2014). Além disso, a ativação do B₂R pode provocar a abertura de canais de K⁺ causando a hiperpolarização celular, que bloqueia os canais de cálcio voltagem-dependentes na membrana da célula (VOC's), assim uma menor [Ca²⁺]_i resulta na redução da resposta celular, e consequente dessensibilização do receptor (Gomes, A.Y.S., 2002). Portanto, a divergência entre a sinalização B₁R e B₂R está associada a mecanismos de dessensibilização.

Figura 8 – Diferentes vias de sinalização metabotrópica são ativadas pelos receptores de cininas.



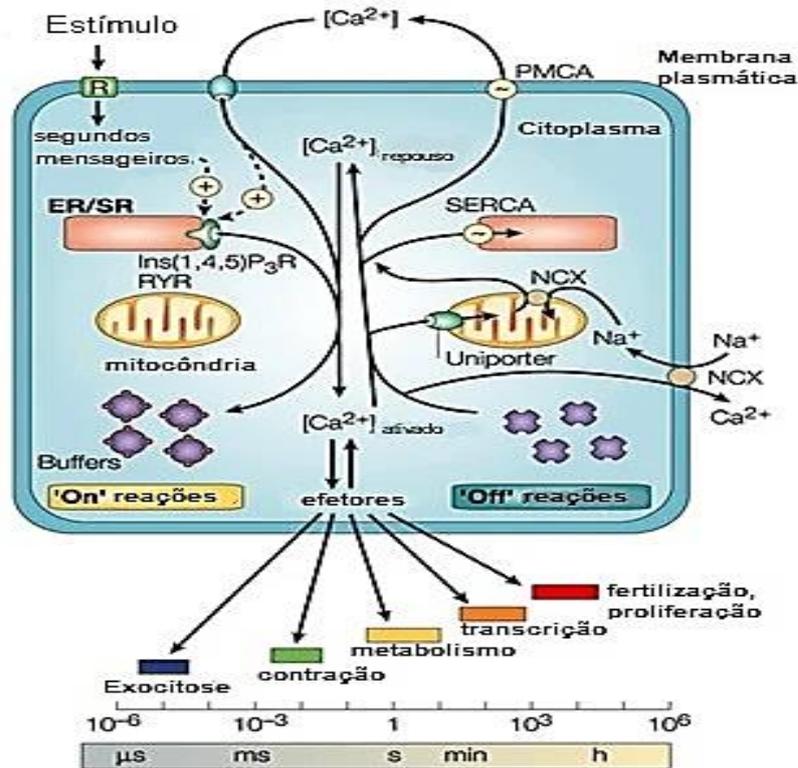
Fonte: Adaptado de Guevara-Lora et al. (2016)

A ativação de vários processos celulares é mediada por B1R e B2R através de diferentes subunidades da proteína G e da proteína β -arrestina. AC, adenilato ciclase; Akt, proteína quinase B; AP-1, proteína ativadora 1; BK, bradicinina; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; c-Fos, proto-oncogene c-Fos; DABK, des-arg9-BK; DAG, diacilglicerol; DAKD, des-arg10-calidina; IP $_3$, inositol 1,4,5-trifosfato; KD, calidina; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MEK, proteína quinase da MAPK; NF κ B, fator nuclear *kappa* B; NO, óxido nítrico; p53, proteína tumoral P53 (TP53); PGI $_2$, prostaciclina; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína quinase C; FLC β , fosfolipase C beta.

A concentração de cálcio (Ca^{2+}) é reguladora de diversos processos celulares como ativação de canais iônicos, contração celular, transcrição de genes, exocitose e transmissão sináptica (Cheng, H., et al. 2006). Para alcançar essa versatilidade, o sistema de sinalização de Ca^{2+} opera de muitas maneiras diferentes para regular processos celulares que funcionam numa ampla faixa dinâmica (Figura 9). Na junção sináptica, por exemplo, o Ca^{2+} induz a exocitose em microssegundos, enquanto no outro extremo da escala o Ca^{2+} tem de atuar por vários minutos até horas para conduzir eventos como a transcrição genética e a proliferação celular (Berridge, M.J., et al. 2003). A concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) é 20.000 vezes menor que a extracelular. As células utilizam vários meios para controlar os níveis de cálcio, como canais, bombas e tampões citosólicos, assim, quando ocorre estimulação elétrica,

hormonal ou mecânica, as células respondem aumentando a $[Ca^{2+}]_i$ por meio do influxo do íon extracelular ou pela liberação dos estoques intracelulares (Bootman et al. 2001).

Figura 9 - Dinâmica de sinalização de cálcio e homeostase.



Fonte: Adaptado de Berridge, M. J., et al. (2003)

Durante as reações ligadas (On), os estímulos induzem tanto o influxo do Ca²⁺ externo quanto a formação de segundos mensageiros que liberam o Ca²⁺ armazenado no retículo endoplasmático/sarcoplasmático (ER/SR). A maior parte deste Ca²⁺ (mostrado como círculos vermelhos) está ligada a tampões (buffers), enquanto uma pequena proporção se liga aos efetores que ativam vários processos celulares que operam num amplo espectro temporal. Durante as reações desligadas (Off), o Ca²⁺ deixa os efetores e tampões sendo removido da célula por vários trocadores e bombas, como o trocador Na⁺ /Ca²⁺ (NCX) e a membrana plasmática Ca²⁺ -ATPase (PMCA) que liberam o cálcio para o exterior, enquanto o retículo sarco(endo)plasmático Ca²⁺ -ATPase (SERCA) bombeia cálcio de volta para o RE. As mitocôndrias também têm uma função ativa durante o processo de recuperação, pois sequestram Ca²⁺ rapidamente através de um canal uniportador, e este é então liberado mais lentamente de volta ao citosol para ser armazenado pelo SERCA ou liberado pelo PMCA. A sobrevivência celular depende da homeostase do Ca²⁺, em que os fluxos de Ca²⁺ durante as reações desligadas correspondem exatamente àqueles durante as reações ligadas. [Ca²⁺]_i, concentração de Ca²⁺; Ins(1,4,5)P₃R, receptor de inositol-1,4,5-trisfosfato; RYR, receptor de rianodina (Berridge, M.J., et al. 2003)

A sinalização intracelular mediada por cininas é altamente influenciada pela $[Ca^{2+}]_i$, visto que a intensidade e a duração dessa sinalização varia conforme a concentração do cálcio presente no citoplasma celular, sendo a sinalização via B₁R é

mais intensa e duradoura que a do B₂R por conta do influxo de cálcio extracelular, além do cálcio liberado do RE (Reiko, T., et al. 2018). Essa diferença também influencia nos efeitos que cada receptor irá mediar, sendo o B₁R amplamente associado a efeitos ocorridos em processos inflamatórios, como a migração e ativação de leucócitos (Duchene, J., et al. 2007). Enquanto o B₂R é mais reconhecido por mediar processos fisiológicos comuns ao organismo, como a regulação da pressão arterial, uma vez que esse receptor é bastante conhecido por mediar a vasodilatação (Dendorfer, A., et al. 1999) após ser estimulado pela BK.

Em síntese, podemos definir que após a ligação das cininas aos receptores diferentes vias de sinalização podem ser ativadas meio das suas interações com as diferentes proteínas G, principalmente G α q/11, afetando diretamente a $[Ca^{2+}]_i$ que é capaz de influenciar na intensidade e duração da via de sinalização ativada, como também qual o efeito fisiopatológico será promovido ao final da cascata de sinalização disparada por cininas. Visto que cada tipo celular é afetado distintamente pelo SCC e ainda apresentam proteomas específicos para a sinalização dependente do cálcio (Sanderson, M. J., et al.1994). Os proteomas correspondem a um conjunto de enzimas e suas variantes que podem ser encontrados numa célula específica quando esta está sujeita a um certo estímulo. Dessa forma, a ativação dos receptores de cininas está relacionada com diversos eventos que acontecem em processos fisiopatológicos, como a nocicepção (Couture, R., et al. 2001), inflamação (Qadri, F., et al. 2018), funções cardiovasculares (Savvatis, K., et al. 2010), lesões renais (Kakoki, M., et al. 2009), câncer (da Costa, P. L., et al. 2013) entre outros.

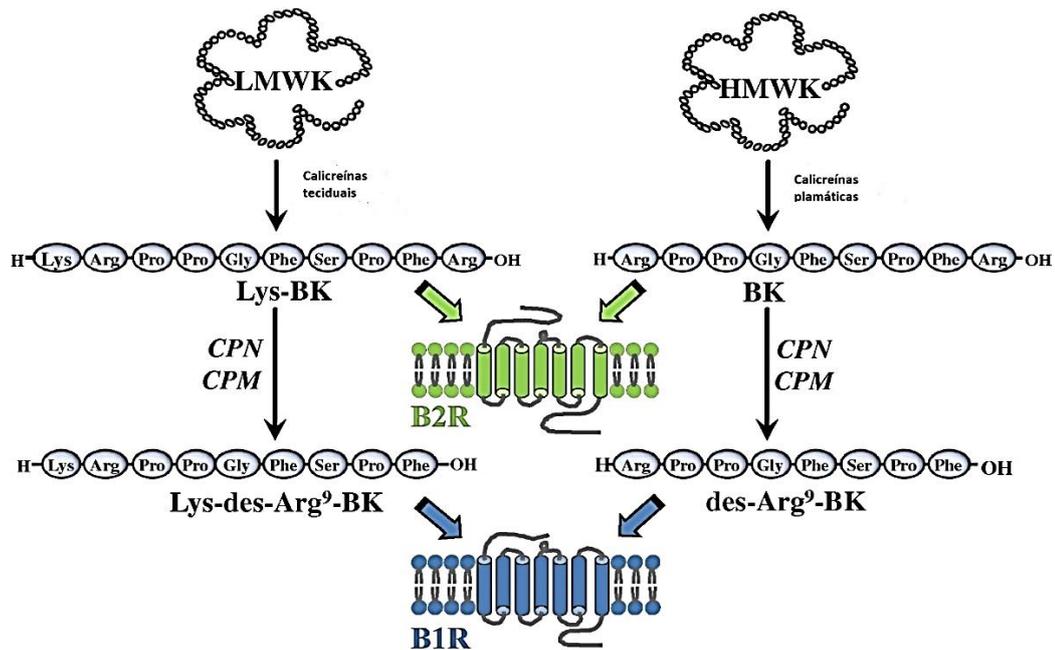
4.2.3 Metabolização das cininas

Como já citado anteriormente, diversas peptidases (cininases) podem metabolizar as cininas em metabólitos ativos ou inativos, sendo que todas elas possuem características em comum, elas são metalopeptidases dependentes do íon zinco, ou seja, precisam da ligação do íon Zn^{+2} ao seu sítio catalítico para haver a clivagem do substrato. Essas cininases são glicoproteínas ancoradas a membrana celular, com exceção da carboxipeptidase N que é encontrada solúvel no plasma.

As cininas “nativas”, bradiginina e calidina, podem ser metabolizadas por diversas cininases, porém apenas as carboxipeptidases M e N (CPM e CPN) geram metabólitos ativos (des-arg-cininas). Sendo CPM e a CPN glicoproteínas encontradas na membrana celular ou plasma, respectivamente. Essas metalopeptidases atuam

clivando a arginina-carboxi-terminal, dando origem à des-arg⁹-bradicinina, des-arg¹⁰-calidina e a Lys-des-arg⁹-BK (Figura 10). Em condições fisiológicas regulares, a BK tem uma meia-vida muito curta de 17-30s antes que essa molécula ativa seja metabolizada pelas cininases; no entanto, isso é longo o suficiente para desencadear a sinalização intracelular iniciada por meio do B₂R (Kashuba, E. et al. 2013).

Figura 10 - Formação das cininas “nativas” e dos metabolitos ativos.



Fonte: Adaptado de Costa et al. (2013)

A principal peptidase conhecida na formação dos metabolitos inativos é a enzima conversora de angiotensina (ECA), também chamada de cininase II (Fig. 2). A ECA é conhecida primeiramente pela sua função no sistema renina-angiotensina, convertendo a angiotensina I em angiotensina II, o que, inclusive, nomeou esta enzima, ela também apresenta alta afinidade pela bradicinina, sendo a principal responsável pela sua inativação, gerando produtos de degradação inativos, como a BK-1-7. Além da bradicinina a ECA também é capaz de inativar outras cininas ativas, como a des-arg⁹-BK que é metabolizada gerando a BK 1-5 (fragmento inativo). Além da ECA, outras peptidases, como a neprilisina e a aminopeptidase P, são capazes de metabolizar a BK e a desarg⁹-BK, inativando-as (Alves da Silva, T. 2022).

As cininas “nativas”, BK e Lys-BK, possuem alta afinidade pelo B₂R, enquanto os metabolitos ativos, des-arg⁹-BK e Lys-des-arg⁹-BK, são agonistas seletivos do B₁R. Todos os peptídeos gerados a partir da BK não se ligam de forma significativa

ao B₁R, mas calidina se liga tanto ao B₂R, quanto ao B₁R (Leeb-Lundberg, L.M.F., et al. 2005). Visto que na maioria dos mamíferos, o peptídeo de maior afinidade pelo B₁R é a des-arg10-calidina, seguida em ordem de afinidade pela calidina e pela des-arg9-BK, que possuem a mesma afinidade por este receptor (valor de K_i).

Quadro 2. Afinidade das cininas pelos receptores de cininas em humano, camundongo e coelho.

| Cininas | Afinidade (K _i , [nM]) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|----------|------------|--------|--------|--------|
| | Humano | | Camundongo | | Coelho | |
| | B1R | B2R | B1R | B2R | B1R | B2R |
| BK | > 10,000 | 0.54 | 200 | 0.48 | > 5000 | 4.5 |
| Calidina (Lys-BK) | 2.54 | 0.63 | 510 | 0.52 | 19 | 2 |
| des-Arg ⁹ -BK | 1930 | 8100 | 0.7 | 6400 | 32 | > 1000 |
| Lys-des-Arg ⁹ -BK | 0.12 | > 30,000 | 1.7 | 25,000 | 0.23 | > 1000 |

Fonte: Adaptado de Leeb-Lundberg et al. (2005)

A afinidade de um ligante com o seu receptor determina a estabilidade do complexo ligante-receptor: quanto maior a afinidade, mais estável o complexo. Uma maneira simples e direta de medir a afinidade de um fármaco para seu receptor é através de um experimento de saturação com o fármaco marcado radioativamente, por exemplo. Uma vez, que calculando-se a constante de equilíbrio de dissociação (K_d), que representa o inverso da constante de associação (K_a), portanto, inversamente proporcional à afinidade (quanto menor o K_d, maior a afinidade). O K_d representa a concentração molar do fármaco suficiente para ocupar 50% dos seus receptores e, portanto, quanto menor essa concentração, maior é a afinidade da interação. O K_d pode ser também definido, e calculado, pela razão entre a constante de velocidade de dissociação (k₋₁) e a constante de velocidade de associação (k₊₁), ou seja: $K_d = k_{-1} / k_{+1}$. Na maioria dos casos, o pesquisador não tem acesso ao fármaco de interesse marcado, podendo então obter o valor de K_d de forma indireta, em ensaio chamado de competição, onde seu valor é calculado a partir do parâmetro CI₅₀, sendo então denominado de K_i para indicar como foi obtido (o “i” vindo de “indireto” ou “inibição”, já que neste ensaio o ligante de interesse está competindo/inibindo a ligação de um ligante padrão marcado radioativamente). (Noël. 2017)

4.3 Vasodilatação

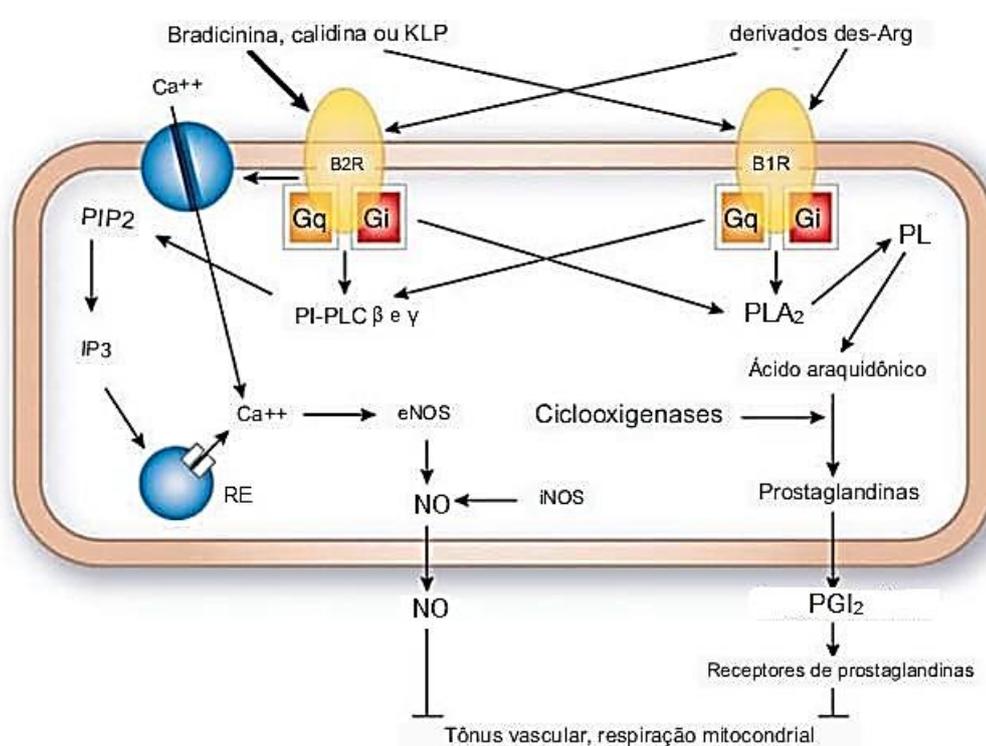
O endotélio é formado por uma monocamada de células endoteliais. Constitui uma barreira física entre o sangue e os tecidos e regula a troca de moléculas entre o sangue e os tecidos. Além disso, as células endoteliais metabolizam, sintetizam e liberam diversas substâncias, estando envolvidas na regulação do tônus e

permeabilidade vascular, coagulação e fibrinólise, reações inflamatórias e imunológicas e crescimento celular (Su, J.B. 2015).

O tônus da musculatura lisa vascular é controlado pelo endotélio, que secreta uma variedade de fatores vasoativos, incluindo diferentes vasodilatadores (relaxantes), como óxido nítrico (NO), prostaciclina, cininas e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE), vasoconstritores (contrateis) como endotelina-1 e PGH₂ e EROs. Os fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs) são liberados constantemente em condições basais. Além disso, o endotélio pode aumentar a liberação de FRDEs em resposta à estimulação por substâncias vasoativas como acetilcolina ou bradicinina (Hornig, B., et al. 1997).

As cininas podem ser geradas nas paredes dos vasos, especialmente nas células endoteliais que contêm componentes como os cininogênios e calicreínas, necessárias para a produção de cininas (Nolly, H., et al. 1994). As cininas são potentes substâncias vasodilatadoras, principalmente a BK, que exercem suas ações vasodilatadoras a partir do momento que estimulam os receptores de cininas presentes nas células endoteliais, principalmente o B₂R (Figura 11), e disparam a cascata de sinalização que promove o aumento da [Ca²⁺]_i, resultando na ativação da óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e), produzindo o NO, como também da fosfolipase A₂ que irá atuar hidrolisando fosfolípídeo e liberando o ácido araquidônico, que será utilizado para a produção de prostaglandinas (PGI₂) pelas ciclooxygenases, sendo que tanto NO quanto PGI₂ são fatores vasodilatadores (Kakoki, M., et al. 2009). Além disso, as cininas podem induzir a vasodilatação via liberação de FHDE (Figini, M., et al. 1996). A estimulação do B₁R pelos seus agonistas também induz vasodilatação mediada pelo NO (Figura 11). Devido à meia-vida muito curta no sangue, a bradicinina desempenha essencialmente um papel autócrino/parácrino.

Figura 11 – Produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas mediadas por cininas.

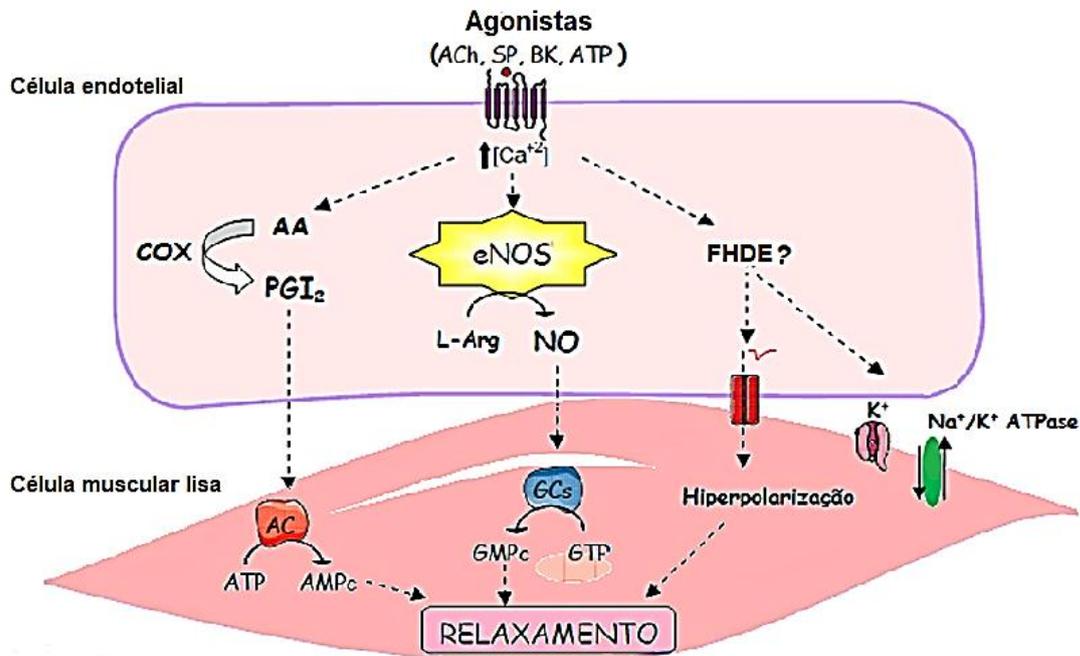


Fonte: Adaptado de Kakoki, M., et al. (2009)

PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PI-PLC, fosfolipase C específica para fosfatidilinositol; IP₃, trifosfato de 1,4,5-inositol; RE, retículo endoplasmático; PL, fosfolipídios; PLA₂, fosfolipase A₂; PGI₂, prostaciclina.

O NO que foi produzido após ação das cininas participa da regulação do tônus vascular, por meio ativação da guanilato ciclase (enzima que converte GTP em GMPc), assim, elevando os níveis do GMPc. Enquanto a PGI₂ produzida ativa a adenilato ciclase (enzima que converte ATP em AMPc) elevando os níveis do AMPc, sendo que ambos os nucleotídeos (GMPc e AMPc) irão induzir o relaxamento musculatura lisa vascular devido a ativação da PKG e da PKA, respectivamente, além da modulação da atividade de canais iônicos (Figura 12). E o FHDE é um conjunto de substâncias que causam hiperpolarização dos miócitos vasculares e espalham a hiperpolarização endotelial à essas células, por meio da abertura de canais de potássio ativados por cálcio, levando ao efluxo de K⁺, que resulta também em vasodilatação, assim esse processo não é afetado em casos de bloqueio da produção de NO ou PGI₂ (Su, J.B. 2015).

Figura 12 - Fatores vasodilatadores originados do endotélio e a ação na musculatura lisa vascular.



Fonte: Adaptado de Michelini, R. (2008)

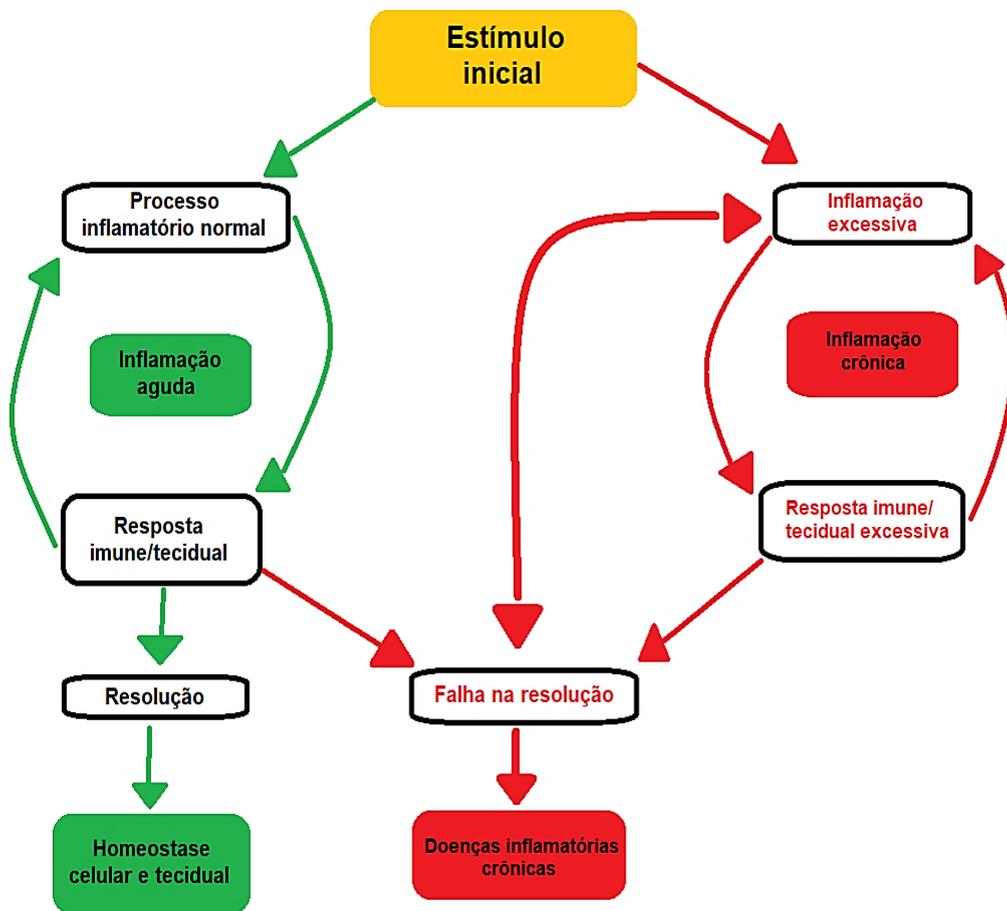
Alguns agonistas de células endoteliais podem ser a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Prostaciclina – PGI₂; óxido nítrico – NO; fator hiperpolarizante derivado do endotélio – EDHF; L-arginina – L-Arg; ácido araquidônico – AA; ciclooxigenase – COX; adenilato ciclase – AC; trifosfato de adenosina – ATP; monofosfato cíclico de adenosina – AMPc; guanilato ciclase solúvel – GCs; fosfato de guanosina trifosfato – GTP; monofosfato cíclico de guanosina – GMPC.

4.4 Inflamação

Em geral, podemos assumir que existem dois tipos de inflamação, aguda e a crônica (Figura 13). A do tipo aguda é uma resposta inicial rápida ao agente agressor, de ação curta, na qual as principais características são o edema e a migração de neutrófilos. Essas características são decorrentes das principais alterações dessa inflamação, como: a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, estase e a migração leucocitária que alteram o fluxo e o calibre vascular. Além disso, também ocorrem os eventos celulares, necessários para o extravasamento leucocitário e a fagocitose do agente nocivo. Enquanto a inflamação crônica é uma resposta de maior

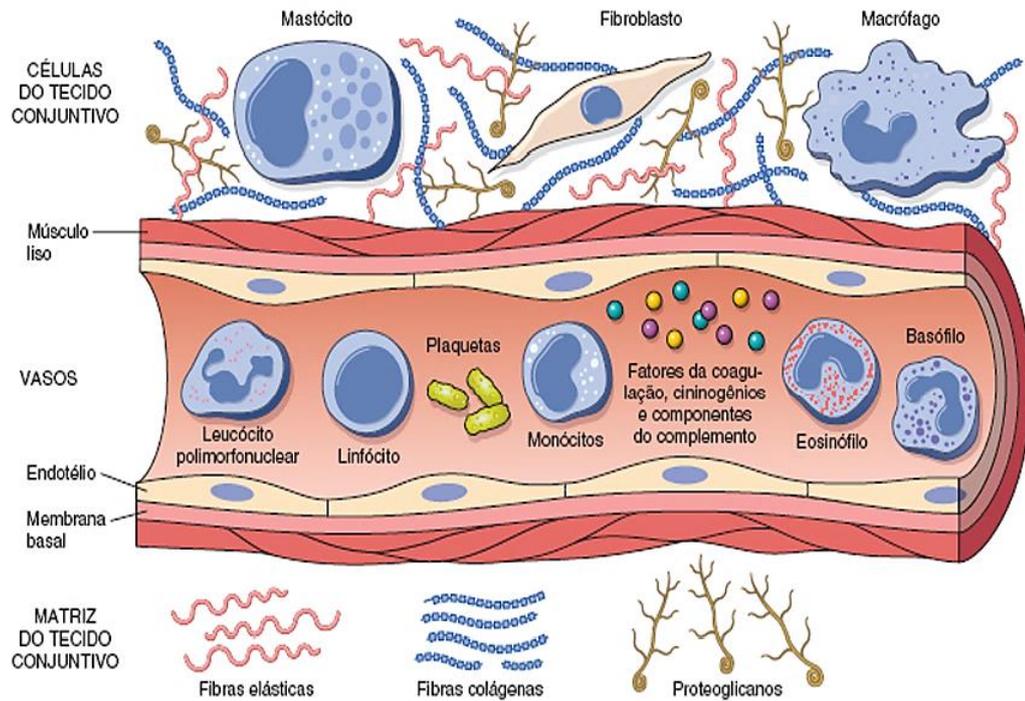
duração, ocorrendo em casos de infecções persistentes, exposição prolongada a agentes tóxicos (endo/exógenos) e doenças autoimunes (Figura 13). Esse tipo crônico apresenta destruição tecidual e tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, simultaneamente. Assim, é possível observar presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos, fibrose e necrose nos tecidos acometidos.

Figura 13 – Tipos de inflamação: aguda e crônica.



No início de uma resposta inflamatória, ocorre a ativação e interligação de várias cascatas metabólicas, envolvendo o sistema complemento, sistema de coagulação, sistema de fibrinólise e o sistema caliceína-cininas, a fim de propagar e amadurecer a reação inflamatória (Figura 14). A função chave do SCC em uma resposta inflamatória é a síntese de proteínas associadas à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e dor (Dendorfer, A. et al., 1999).

Figura 14 – Componentes de uma resposta inflamatória aguda e crônica: células e proteínas circulantes, células vasculares e as células e proteínas da matriz extracelular.



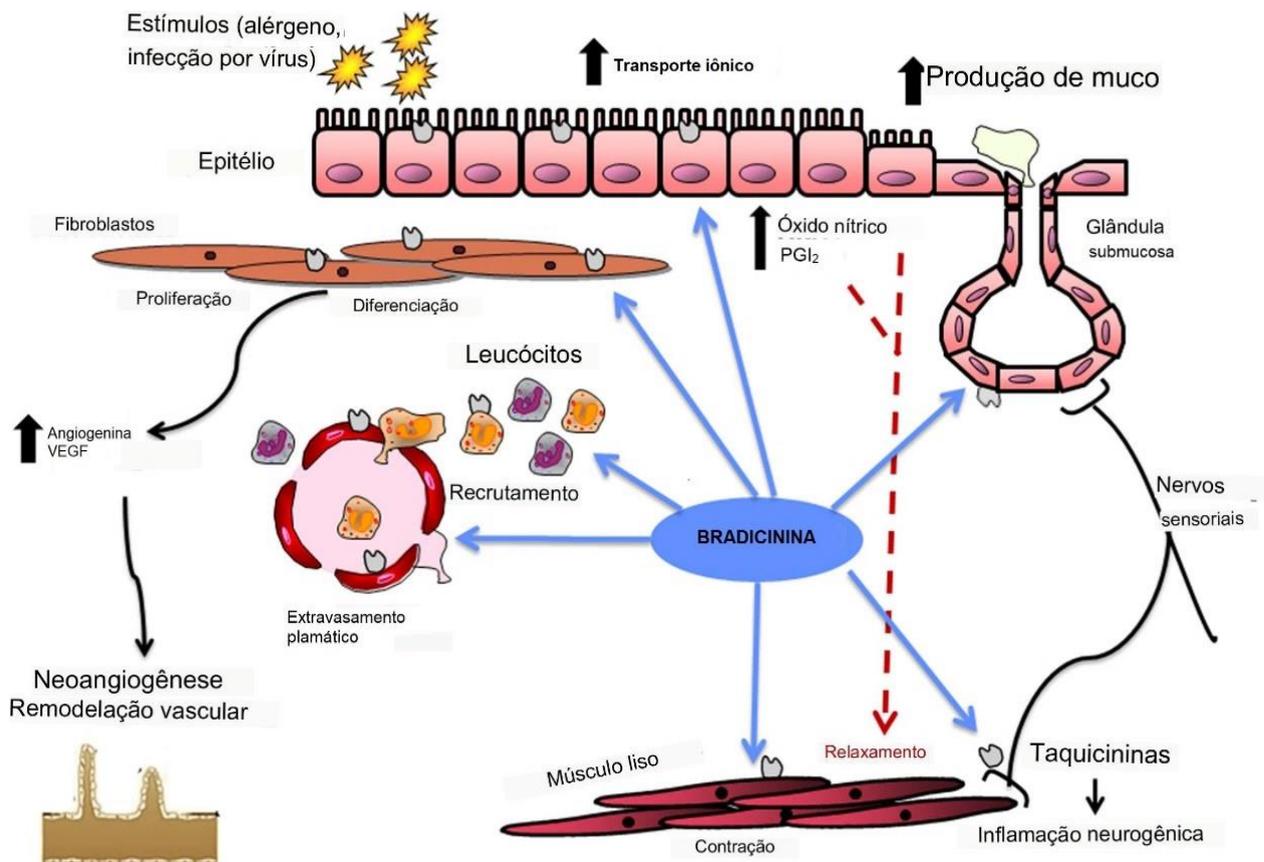
Fonte: Brito, L.A.B. (2014)

A BK é capaz de potencializar processos inflamatórios, visto que já foi demonstrado que esse peptídeo induz diversos eventos fisiopatológicos (Figura 15), como a vasodilatação e permeabilidade vascular (Ricciardolo, F.L.M., et al. 1994); medeia o recrutamento de células inflamatórias (Sato, E. et al., 2000, Perron et al. 1999, Duchene, J. et al., 2007), a produção de óxido nítrico (Ricciardolo, F.L.M., et al. 2000) e a liberação de prostanóides (Li, L., et al., 1998), taquicinas (Geppetti, P. et al. 1995) e citocinas/quimiocinas (Koyama, S. et al., 2000). Além disso, a BK induz o espasmo da musculatura lisa (vias aéreas) (Figini, M. et al., 1996), como também pode estimular neurônios sensoriais resultando em hiperalgesia crônica (Schuelert, et al., 2015), alterar a secreção de íons pelas células epiteliais (Cozens, A.L. et al., 1994) e modular a migração celular e lesão tecidual (Abraham, W.M. et al., 2006).

Uma ampla variedade de tecidos pode ser afetada pelas ações das cininas, por exemplo, as vias aéreas, que em casos de inflamação a bradicinina pode desencadear diversos eventos que vão culminar na potencialização deste processo (Ricciardolo, F.L.M., et al. 2018). A BK quando estimula o epitélio das vias aéreas, resultando na

liberação de fatores bronco relaxante, PGI₂ e óxido nítrico, secreção de muco das glândulas submucosas e no aumento do transporte iônico (Figura 15). Além disso, a BK é um potente indutor do extravasamento microvascular e da permeabilidade vascular, que resulta no extravasamento plasmático prolongado em todos os níveis das vias aéreas afetadas (Figura 15). Esse peptídeo também é capaz de induzir remodelação vascular, quando estimula os receptores cininas presentes em fibroblastos, que após isso são ativados, e liberam os fatores de crescimento vascular (VEGF e angiogenina) (Figura 15). Dessa forma, podemos definir que a BK é capaz de influenciar na progressão do quadro inflamatório, assim, uma inflamação aguda pode se tornar crônica através da ação desse peptídeo, e uma doença crônica, como a asma nas vias aéreas, se instalar.

Figura 15 – Eventos mediados pela BK em processos inflamatórios.



Fonte: Adaptado de Ricciardolo, F.L.M., et al. 2018

5. CONCLUSÃO

A bradicinina (BK) é a molécula principal do sistema caliceína-cininas, um sistema hormonal envolvido em diversos processos fisiopatológicos. As ações relacionadas a esse sistema são mediadas pelas cininas, principalmente a BK, que exercem ações biológicas após interagirem com os receptores B1 e B2 de cininas. Além disso, outras cininas ativas como: a calidina (Lys-BK) e os metabolitos ativos, des-arg⁹-BK e des-arg⁹-calidina também exercem ações biológicas por meio desses receptores.

Essas cininas ativas são capazes de promoverem a vasodilatação após interagirem com os receptores de cininas das células endoteliais, ativando a cascata sinalização que promove o aumento da concentração do cálcio intracelular, resultando na ativação de enzimas que vão catalisar a produção e liberação de fatores vasodilatadores, como NO e PGI₂. Esses fatores vasodilatadores após serem liberados vão atuar nas células musculares lisas, promovendo o aumento dos níveis de GMPc e AMPc, que irão ativar a PKG e PKA, respectivamente, além de modularem a atividade dos canais iônicos, resultando no relaxamento da musculatura lisa vascular, ou seja, na vasodilatação.

As cininas ativas, principalmente BK, são capazes de influenciar na progressão de quadros inflamatórios. Visto que esses peptídeos podem mediar os eventos comuns a inflamação aguda, como: vasodilatação, permeabilidade vascular, migração de leucócitos, aumento do transporte iônico, produção de NO e prostaglandinas. Além disso, em alguns tecidos, por exemplo, as vias aéreas as cininas podem mediar eventos que vão influenciar na cronicidade do quadro inflamatório, por meio da modulação de eventos, como: extravasamento microvascular, remodelação vascular e hiperalgesia crônica. Portanto, uma alta atividade de cininas é capaz potencializar quadros inflamatórios, assim, uma inflamação aguda pode se tornar crônica através da ação desses peptídeos, e uma doença crônica, como a asma nas vias aéreas, pode se instalar.

A concentração do cálcio intracelular influencia altamente a sinalização intracelular e ações biológicas mediadas pelas cininas ativas, visto que a intensidade e a duração dessa sinalização variam conforme a concentração do cálcio presente no citoplasma celular, sendo a sinalização via B₁R (mediada pelos metabolitos ativos) é

mais intensa e duradoura que a do B₂R (mediada por BK e calidina) por conta do influxo de cálcio extracelular, além do cálcio liberado do RE. Essa diferença também influencia nos efeitos que cada receptor irá mediar, sendo o B₁R amplamente associado a efeitos ocorridos em processos inflamatórios, como a migração e ativação de leucócitos. Enquanto o B₂R é mais reconhecido por mediar processos fisiológicos comuns ao organismo, como a regulação da pressão arterial, por meio da vasodilatação.

Em síntese, a bradicinina e seus metabolitos ativos são peptídeos capazes de modularem diversas ações biológicas, que podem ser benéficas ou não para o organismo. A vasodilatação promovida por essas moléculas pode ser considerada benéfica, pois em condições normais é importante para regular a pressão arterial, e em casos de inflamação é necessária para melhorar o fluxo sanguíneo, favorecendo a migração leucocitária para o local lesionado, além disso é um importante mecanismo de termorregulação. Entretanto, uma alta atividade de cininas em quadros inflamatórios pode resultar em cronicidade da inflamação, uma vez que essas moléculas também são capazes de modular eventos fisiopatológicos que favorecem a progressão da inflamação aguda para crônica, o que pode resultar na instalação de uma doença crônica no organismo.

6. REFERÊNCIAS

Abraham, W.M.; Scuri, M.; Farmer, S.G. **Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: role in allergic airway disease.** Eur. J. Pharmacol., 533 (2006), pp. 215-221, 10.1016/j.ejphar.2005.12.071

Alves da Silva, Thais. **Ausência do receptor B1 de cininas materno afeta o metabolismo da prole.** Orientador(a): Prof. Dr. Ronaldo Carvalho Araújo. 2022. 123 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo/SP, 2022.

Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick, H. L. **Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4(7), 517–529. doi:10.1038/nrm1155

Bekassy, Z.; Lopatko Fagerström, I.; Bader, M.; Karpman, D. **Crosstalk between the renin-angiotensin, complement and kallikrein-kinin systems in inflammation.** Nat Rev Immunol. 2022 Jul;22(7):411-428. doi: 10.1038/s41577-021-00634-8. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34759348; PMCID: PMC8579187.

Bootman, M.D.; Lipp, P.; Berridge, M.J. **The organization and functions of local Ca²⁺ signals.** *J Cell Sci.* 2001,14: 2213–2222

Brito, L. A. B. **Patologia geral – processo inflamatório geral – conceitos.** 2014. Escola de veterinária e zootecnia – Universidade Federal de Goiás.

Busse, R. & Fleming, I. **Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation.** Ann Med. 1995 Jun;27(3):331-40. doi: 10.3109/07853899509002586. PMID: 7546623.

Busse, R. & Fleming, I. **Molecular responses of endothelial tissue to kinins.** *Diabetes.* 1996 Jan;45 Suppl 1:S8-13. doi: 10.2337/diab.45.1.s8. PMID: 8529805.

Calixto, J.B.; Cabrini, D.A.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; **Kinins in pain and inflammation.** Pain. 2000 Jul;87(1):1-5. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00335-3. PMID: 10863040.

Catalioto, R.M.; Valenti, C.; Maggi, C.A.; Giuliani, S. **Enhanced Ca²⁺ response and stimulation of prostaglandin release by the bradykinin B2 receptor in**

human retinal pigment epithelial cells primed with proinflammatory cytokines. *Biochem Pharmacol.* 2015 Sep 15;97(2):189-202. doi: 10.1016/j.bcp.2015.07.034. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26235941.

Cheng, H.; Wei, S.; Wei, L.; Verkhatsky, A. **Calcium signaling in physiology and pathophysiology.** *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, 27(7), 767–772. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00399

Copeland R.A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery.** A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists (2005), John Wiley & Sons, Inc, Publication Hoboken, New Jersey.

Couture, R.; Harrisson, M.; Vianna, R.M.; Cloutier, F. **Kinin receptors in pain and inflammation.** *Eur J Pharmacol.* 2001 Oct 19;429(1-3):161-76. doi: 10.1016/s0014-2999(01)01318-8. PMID: 11698039.

Cozens, A.L.; Yezzi, M.J.; Kunzelmann, K.; Ohrui, T.; Chin, L.; Eng, K.; Finkbeiner, W.E.; Widdicombe, J.H.; Gruenert, D.C. **CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 10 (1994), pp. 38-47

da Costa, P.L.; Sirois, P.; Tannock, I.F.; Chammas, R. **The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities.** *Cancer Lett.* 2014 Apr 1;345(1):27-38. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.009. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24333733.

da S. Emim, J.A.; Souccar, C.; de A. Castro, M.S.; Godinho, R.O.; Cezari, M.H.; Juliano, L.; Lapa, A.J. **Evidence for activation of the tissue kallikrein-kinin system in nociceptive transmission and inflammatory responses of mice using a specific enzyme inhibitor.** *Br J Pharmacol.* 2000 Jul;130(5):1099-107. doi: 10.1038/sj.bjp.0703362. PMID: 10882395; PMCID: PMC1572148.

de França, C.E.; Guardabassi, C.; Smith, R.L. **Expressão e Distribuição do Receptor B2 da Cinina em Tecidos Medulares e Medulares de Ratos Tratados com Capsaicina.** *Int. J. Morphol. Temuco*, v. 34, n. 4, pág. 1465-1471, dic. 2016. DOI: 10.4067/S0717-95022016000400047.

Dendorfer, A.; Wolfrum, S.; Dominiak, P. **Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system.** Jpn J Pharmacol. 1999 Apr;79(4):403-26. doi: 10.1254/jjp.79.403. PMID: 10361880.

Dixon, B.S.; Evanoff, D.; Fang, W.B.; Dennis, M.J. **Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1.** Am J Physiol Cell Physiol. 2002;283(1):C193-203.

Duchene, J.; Lecomte, F.; Ahmed, S.; Cayla, C.; Pesquero, J.; Bader, M.; Perretti, M.; Ahluwalia, A. **A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5.** J. Immunol., 179 (2007), pp. 4849-4856

Dutra, R.C. **Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity.** Autoimmun Rev. 2017 Feb;16(2):192-207. doi: 10.1016/j.autrev.2016.12.011. Epub 2016 Dec 15. PMID: 27988430.

Enquist, J.; Sanden, C.; Skroder, C.; Mathis, S.A.; Leeb-Lundberg, L.M.F. **Kinin stimulated B1 receptor signaling depends on receptor endocytosis whereas B2 receptor signaling does not.** Neurochem, 2014, Res 39: 1037–1047. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-013-1126-9>.

Faussner, A.; Proud, D.; Towns, M.; Bathon, J.M. **Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction.** J Biol Chem. 1998;273(5):2617-23

Figini, M.; Ricciardolo, F.L.M.; Javdan, P.; Nijkamp, F.P.; Emanuelli, C.; Pradelles, P.; Folkerts, G.; Geppetti, P. **Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in the guinea pig trachea is nitric oxide** Am. J. Respir. Crit. Care Med., 153 (1996), pp. 918-923, 10.1164/ajrccm.153.3.8630573.

Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Busse, R. **Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases.** Circ Res. 1995;76(4):522-9.

Franco, R.F. **Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise.** Medicina, Ribeirão Preto,34:229-237, jul./dez. 2001.

Fujisawa, H.; Ito, H.; Kashiwagi, S.; Nomura, S.; Toyosawa, M. **Kallikrein-kinin system in chronic subdural haematomas: its roles in vascular permeability and regulation of fibrinolysis and coagulation.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995 Oct;59(4):388-94. doi: 10.1136/jnnp.59.4.388. PMID: 7561918; PMCID: PMC486075.

Geppetti, P.; Bertrand, C.; Ricciardolo, F.L.M.; Nadel, J.A. **New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation** Can. J. Physiol. Pharmacol., 73 (1995), pp. 843-847

Gomes, Ana Yara Serrano. **Aspectos farmacologicos e eletrofisiologicos da dessensibilizacao do ileo de cobaia a bradicinina.** Orientador(a): Viviane Louise Andreé Nouailhetas. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo/SP, 2002.

Guevara-Lora, I.; Niewiarowska-Sendo, A.; Polit, A.; Kozik, A. **Hypothetical orchestrated cooperation between dopaminergic and kinin receptors for the regulation of common functions.** Acta Biochim Pol. 2016;63(3):387-96. doi: 10.18388/abp.2016_1366. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27486919.

Hornig, B. & Drexler, H. **Função Endotelial e Bradicinina em Humanos.** Drogas 54 (Suplemento 5), 42–47 (1997). <https://doi.org/10.2165/00003495-199700545-00007>

Inflamação aguda e crônica. Universidade Federal do Acre – patologia geral, 2017. Disponível em: <http://www2.ufac.br/geralpat/inflamacao-aguda-e-cronica>

Kakoki, M. & Smithies, O. **The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney.** Kidney Int. 2009 May;75(10):1019-30. doi: 10.1038/ki.2008.647. Epub 2009 Feb 4. PMID: 19190676; PMCID: PMC3733452.

Kaplan, A.P.; Joseph, K.; Silverberg, M. **Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease.** J Allergy Clin Immunol. 2002 Feb;109(2):195-209. doi: 10.1067/mai.2002.121316. PMID: 11842287.

Kashuba, E.; Bailey, J.; Allsup, D.; Cawkwell, L. **The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer**

biomarkers. Biomarkers. 2013 Jun;18(4):279-96. doi: 10.3109/1354750X.2013.787544. Epub 2013 May 15. PMID: 23672534.

Koyama, S.; Sato, E.; Numanami, H.; Kubo, K.; Nagai, S.; Izumi, T. **Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity** Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 22 (2000), pp. 75-84. doi: 10.1165/ajrcmb.22.1.3752

Leeb-Lundberg, L.M.F.; Marceau, F.; Müller-Esterl, W.; Pettibone, D.J.; Zuraw, B.L. **Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences.** International Union of Pharmacology. XLV. Pharmacological Reviews. 2005;57(1):27-77.

Liao, J.K. & Homcy, C.J. **The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor.** J Clin Invest. 1993 Nov;92(5):2168-72. doi: 10.1172/JCI116818. PMID: 8227332; PMCID: PMC288395.

Li, L.; Vaali, K.; Paakkari, I.; Vapaatalo, H. **Involvement of bradykinin B1 and B2 receptors in relaxation of mouse isolated trachea.** Br. J. Pharmacol., 123 (1998), pp. 1337-1342. doi: 10.1038/sj.bjp.0701741

Marceau, F.; Sabourin, T.; Houle, S.; Fortin, J.P.; Petitclerc, E.; Molinaro, G.; Adam, A. **Kinin receptors: functional aspects.** Int Immunopharmacol. 2002 Dec;2(13-14):1729-39. doi: 10.1016/s1567-5769(02)00189-3. PMID: 12489786.

Marceau, F.; Bouthillier, J.; Houle, S.; Sabourin, T.; Forin, J.P.; Morissette, G.; Lodge, R.; Fortin, S.; Gaudreault, R.C.; Bawolak, M.T.; Koumbadinga, G.A.; Roy, C.; Charest-Morin, X.; Gera, L. **Bradykinin receptors: agonists, antagonist, expression, signaling and adaptation to sustained stimulation.** J Angioedema, 2013, 1: 1–9.

Mathis, S.A.; Criscimagna, N.L.; Leeb-Lundberg, L.M. **B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells.** Mol Pharmacol. 1996 Jul;50(1):128-39. PMID: 8700105.

Medzhitov, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** Nature 454, 428–435 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07201>

Michelini, L.C. & Rossoni, L.V. **Vasomotricidade e regulação local de fluxo.** In: AIRES, M. M. (Org.). Fisiologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 497-513.

Neubig, R.R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. **International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification.** XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. Pharmacol. Rev. 55: 597–606, 2003. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.4>

Noël, F. **Ensaio de binding: fundamentos teóricos, aspectos práticos e aplicações no desenvolvimento de fármacos.** (2017), e-book. François Germain Noël – Rio de Janeiro. ISBN 978-85-923439-0-3.

Nolly, H.; Damiani, M.T.; Miatello, R. **Vascular-derived kinins and local control of vascular tone.** Braz J Med Biol Res. 1994 Aug;27(8):1995-2011. PMID: 7749391.

Perron, M.S.; Gobeil Jr., F.; Pelletier, S.; Regoli, D.; Sirois, P. **Involvement of bradykinin B1 and B2 receptors in pulmonary leukocyte accumulation induced by Sephadex beads in guinea pigs.** Eur. J. Pharmacol., 376 (1999), pp. 83-89

Pinheiro, A.R.; Paramos-de-Carvalho, D.; Certal, M.; Costa, C.; Magalhães-Cardoso, M.T.; Ferreirinha, F.; Costa, M.A.; Correia-de-Sá, P. **Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation.** Cell Commun Signal. 2013 Sep 18; 11:70. doi: 10.1186/1478-811X-11-70. PMID: 24047499; PMCID: PMC3848849.

Ponczek, M.B. **High Molecular Weight Kininogen: A Review of the Structural Literature.** Int J Mol Sci. 2021 Dec 13;22(24):13370. doi: 10.3390/ijms222413370. PMID: 34948166; PMCID: PMC8706920.

Qadri, F. & Bader, M. **Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation.** *Expert Opin Ther Targets.* 2018 Jan;22(1):31-44. doi: 10.1080/14728222.2018.1409724. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29168929.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. **Rang & Dale. Farmacologia.** 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012.808 p.

Reiko, T.; Maki, K.; Asuka, H.; Yuki, K.; Tatsuya, I.; Masakazu, T.; Yoshiyuki, M. **Intracellular Ca²⁺ mobilization pathway via bradykinin B1 receptor activation in rat trigeminal ganglion neurons.** *The Journal of Physiological Sciences, JAPÃO*, ed. 69, p. 199-209, 4 set. 2018. DOI: 10.1007/s12576-018-0635-3.

Ricciardolo, F.L.M.; Nadel, J.A.; Bertrand, C.; Yamawaki, I.; Chan, B.; Geppetti, P. **Tachykinins and kinins in antigen-evoked plasma extravasation in guinea-pig nasal mucosa.** *Eur. J. Pharmacol.*, 261 (1994), pp. 127-132

Ricciardolo, F.L.M.; Vergnani, L.; Wiegand, S.; Ricci, F.; Manzoli, N.; Fischer, A.; Amadesi, S.; Fellin, R.; Geppetti, P. **Detection of nitric oxide release induced by bradykinin in guinea pig trachea and main bronchi using a porphyrinic microsensor** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 22 (2000), pp. 97-104, 10.1165/ajrcmb.22.1.3706

Ricciardolo, F.L.M.; Nadel, J.A.; Graf, P.D.; Bertrand, C.; Yoshihara, S.; Geppetti, P. **Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs.** *Br. J. Pharmacol.*, 113 (1994), pp. 508-512

Ricciardolo, F.L.M.; Folkerts, G.; Folino, A.; Mognetti, B. **Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling.** *Eur J Pharmacol.* 2018 May 15; 827:181-188. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.03.017. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29548973.

Sanderson, M.J.; Charles, A.C.; Boitano, S.; Dirksen, E.R. **Mechanisms and function of intercellular calcium signaling.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 98(2), 173–187. doi:10.1016/0303-7207(94)90136-8

Sato, E.; Nelson, D.K.; Koyama, S.; Hoyt, J.C.; Robbins, R.A. **Bradykinin stimulates eotaxin production by a human lung fibroblast cell line.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106 (2000), pp. 117-123, 10.1067/mai.2000.107400

Savvatis, K.; Westermann, D.; Schultheiss, H.P.; Tschöpe, C. **Kinins in cardiac inflammation and regeneration: insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy.** *Neuropeptides*. 2010 Apr;44(2):119-25. doi: 10.1016/j.npep.2009.11.007. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20036002.

Schölkens, B.A. **Kinins in the cardiovascular system.** *Immunopharmacology*. 1996, Jun;33(1-3):209-16. doi: 10.1016/0162-3109(96)00061-6. PMID: 8856152.

Schuelert, N.; Just, S.; Corradini, L.; Kuelzer, R.; Bernloehr, C.; Doods, H. **The bradykinin B1 receptor antagonist BI13823 reverses inflammatory hyperalgesia by desensitization of peripheral and spinal neurons.** *Eur. J. Pain*. Lond. Engl., 19 (2015), pp. 132-142, doi: 10.1002/ejp.573

Sharma, J.N. **The kallikrein-kinin system: from mediator of inflammation to modulator of cardioprotection.** *Inflammopharmacology*. 2005;12(5-6):591-6. doi: 10.1163/156856005774382760. PMID: 16259723.

Sharma, J.N. & Sharma J. **Cardiovascular properties of the kallikrein-kinin system.** *Curr Med Res Opin*. 2002;18(1):10-7. doi: 10.1185/03007990212500093. PMID: 11999140.

Sharif, N.A.; Wang, Y.; Katoli, P.; Xu, S.; Kelly, C.R.; Li, L. **Human non-pigmented ciliary epithelium bradykinin B2-receptors: receptor localization, pharmacological characterization of intracellular Ca (2+) mobilization, and prostaglandin secretion.** *Curr Eye Res*. 2014 Apr;39(4):378-89. doi: 10.3109/02713683.2013.816324. Epub 2013 Jul 25. PMID: 24624903.

Smaili, S.; Hirata, H.; Ureshino, R.; Monteforte, T. P.; Morales, P. A.; Muler, L. M.; Terashima, J.; Oseki, K.; Rosenstock, R. T.; Lopes, S. G.; Binconletto, C. **Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências, BRASIL*, v. 81, 16 fev. 2009. 3, p. 467-475. DOI:10.1590/S0001-37652009000300011.

Smith, J.A.; Webb, C.; Holford, J.; Burgess, G.M. **Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells.** *Mol Pharmacol*. 1995 Mar;47(3):525-34. PMID: 7700250.

Su, J.B. **Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment.** *World J Cardiol.* 2015, Nov 26;7(11):719-41. doi: 10.4330/wjc.v7.i11.719. PMID: 26635921; PMCID: PMC4660468.

Tropea, M.M.; Gummelt, D.; Herzig, M.S.; Leeb-Lundberg, L.M. **B1 and B2 kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg9-bradykinin and bradykinin.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Feb;264(2):930-7. PMID: 8382284.

Yamawaki, I.; Geppetti, P.; Bertrand, C.; Chan, B.; Nadel, J.A. **Airway vasodilation by bradykinin is mediated via B2 receptors and modulated by peptidase inhibitors** *Am. J. Physiol.*, 266 (1994), pp. L156-L162

Yarovaya, G.A. & Neshkova, A.E. **Past and present research on the kallikrein-kinin system (on the 90th anniversary of the discovery of the system).** *Russ J Bioorg Chem* **41**, 245–259 (2015). DOI: 10.1134/S1068162015030115

Yikrazuul, CC BY-SA 3.0, via Wikimedia Commons. 2010. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Activation_protein_kinase_C.svg

Zhang, X.; Lowry, J.L.; Brovkovich, V.; Skidgel, R.A. **Characterization of dual agonists for kinin B1 and B2 receptors and their biased activation of B2 receptors.** *Cell Signal.* 2012 Aug;24(8):1619-31. doi: 10.1016/j.cells;.,/;ig.2012.04.002. Epub 2012 Apr 12. PMID: 22522052; PMCID: PMC3362676.