

# **RELAZIONE DI DOTTORATO**

**RESPONSIVITA' ALLE TACHICHININE DI MACROFAGI  
ALVEOLARI ISOLATI DA FUMATORI SANI O PAZIENTI  
CON PATOLOGIE POLMONARI: RUOLO DEI RADICALI  
LIBERI DELL'OSSIGENO, DEL TNF- $\alpha$  E DEL FATTORE  
DI TRASCRIZIONE NF- $\kappa$ B**

**XIX Ciclo - Dottorato di Medicina Molecolare**

**Tutore:  
Prof.ssa Sandra Brunelleschi**

**Dottorando:  
Claudio Bardelli**

## INTRODUZIONE

Le tachichinine sono una famiglia di neuropeptidi ampiamente distribuiti nell'organismo, e sono coinvolte nella regolazione del tono muscolare, della nocicezione, della risposta flogistico-immunitaria etc. (Severini et al., 2002). Le tachichinine, sostanza P (SP), neurochinina A (NKA) e neurochinina B (NKB), presentano una struttura primaria analoga nei mammiferi con una sequenza pentapeptidica C-terminale comune (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>). Il loro nome sta per indicare l'azione veloce con cui agiscono e le distingue dalle chinine ad azione lenta sulla muscolatura liscia, dette appunto bradichinine.

Specie	Tachichinina	Sequenza
Mammifero	Sostanza P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe- <b>Phe</b> -Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Mammifero	Neurochinina A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Mammifero	Neurochinina B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe- <b>Val</b> -Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Ratto/Topo	Emochinina-1	Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Umana	Emochinina-1	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Umana	Endochinina C	Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH <sub>2</sub>
Umana	Endochinina D	Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH <sub>2</sub>

Le tachichinine di mammifero derivano da due geni preprotachichininici comuni: il gene PPT-A che codifica per SP e NKA, ed il gene PPT-B che codifica per NKB. L'mRNA precursore sintetizzato dal gene PPT-A può a sua volta essere processato alternativamente in tre diversi mRNA (Nawa et al., 1984), indicati come  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -PPT mRNA. Dall' $\alpha$ -PPT mRNA origina solo SP, mentre dal  $\beta$ - e  $\gamma$ -PPT mRNA originano sia SP che NKA. Il significato biologico dello splicing alternativo di PPT-A non è ancora ben chiaro, ma sembra essere correlato con una diversa espressione e distribuzione dei peptidi sintetizzati nei diversi tessuti (Nakanishi, 1987). La famiglia delle tachichinine è molto più estesa e questi peptidi sono presenti in tutte le specie animali, dagli invertebrati inferiori ai mammiferi (Severini et al., 2002). La loro distribuzione va dal sistema nervoso centrale, dove agiscono come neurotrasmettitori o neuromodulatori, a quello periferico, dove regolano l'attività di molteplici tipi cellulari. Nel sistema nervoso centrale la SP è in genere co-sintetizzata, co-localizzata e co-secreta con la NKA raggiungendo concentrazioni dell'ordine nanomolare nell'amigdala, nel nucleo caudato, nell'ipotalamo, nella *substantia nigra*, nelle corna dorsali del midollo spinale (Kanazawa and Jessell, 1976; Douglas et al., 1982). La NKB è stata individuata nel bulbo olfattivo, in alcune regioni corticali, in diversi nuclei ipotalamici, nella *substantia nigra*, nel nucleo caudato esterno (Kanazawa et al., 1984; Merchenthaler et al., 1992), ma anche nel midollo spinale (Ogawa et al., 1985).

A livello periferico, la SP induce proliferazione linfocitaria (Payan et al., 1983), aumenta il rilascio di immunoglobuline dalle cellule di linfoma B (Pascual et al., 1991), degranula i mastociti (Mousli et al., 1989), modula l'attività di eosinofili e neutrofili (Iwamoto et al., 1993; Brunelleschi et al., 1991), stimola i monociti a produrre anione superossido (Brunelleschi et al., 1998) e a liberare citochine infiammatorie tra cui interleuchina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 ed *Tumor Necrosis Factor alfa* (TNF- $\alpha$ ) (Lotz et al., 1988; Ho et al., 1996; Lavagno et al., 2001).

L'azione biologica delle tachichinine è mediata da specifici recettori a proteine G, identificati come NK<sub>1-3</sub>. Ognuna delle tre tachichinine presenta un'affinità maggiore per un recettore specifico, pur agendo a concentrazioni appropriate su tutti e tre. L'ordine di affinità del recettore NK<sub>1</sub> per le tachichinine è il seguente: SP>NKA>NKB; per il recettore NK<sub>2</sub> è invece: NKA>NKB>>SP; mentre per l'NK<sub>3</sub> è: NKB>NKA>SP.

Studi di biologia molecolare e di farmacologia tradizionale (utilizzo di agonisti ed antagonisti selettivi) hanno permesso di caratterizzare i tre recettori. L' NK<sub>1</sub> è stato isolato e clonato da cervello e ghiandole salivari di ratto, da polmone umano e da una linea cellulare linfoblastica umana. L'NK<sub>2</sub> è stato isolato e clonato da Masu ed altri nel 1987 da stomaco di bue e successivamente da stomaco di ratto, da trachea e digiuno umani e dal genoma di topo. Infine l' NK<sub>3</sub> è stato isolato da cervello di ratto e successivamente anche umano.

A livello polmonare, NKA è un potente bronco-costrittore, mentre SP induce soprattutto secrezione di muco ed essudazione plasmatica; numerosi studi documentano l'efficacia di antagonisti selettivi delle tachichinine in modelli animali di asma bronchiale, ma meno nell'uomo (Fahy et al., 1995; Joobs et al., 1996; Lagente and Advenier, 1998; Joobs and Pauwels, 2001).

Le infezioni respiratorie sono associate ad aumentati livelli di tachichinine nelle vie aeree (Trippe et al., 2000), nonché ad un aumento delle risposte evocate dalle tachichinine stesse (Saban et al., 1987; Yamawaki et al., 1995), effetto, quest'ultimo, almeno in parte dovuto ad una diminuita attività dell'endopeptidasi neutra, enzima chiave nella degradazione delle tachichinine (Dusser et al., 1989). Un altro enzima importante nella degradazione delle tachichinine, l'*Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), viene rilasciato in maggiori quantità nei fumatori e in pazienti affetti da sarcoidosi (Hinman et al., 1979). Inoltre, elevati livelli di SP sono presenti nei lavaggi bronco-alveolari (BAL) di pazienti con fibrosi polmonare idiomatica o sarcoidosi (Takeyama et al., 1996), così come nell'espettorato indotto in pazienti asmatici o con bronchite cronica (Tomaki et al., 1995). E' stato inoltre dimostrato che il recettore NK<sub>1</sub> è altamente espresso nell'epitelio di soggetti asmatici e nei fumatori (Chu et al., 2000). La sua rapida desensitizzazione è probabilmente dovuta alla fosforilazione intracitoplasmatica dell'estremità C-terminale (Helke et al., 1990) o alla internalizzazione del recettore (Bowden et al., 1994). L'espressione del gene per il recettore NK<sub>2</sub> (a livello di mRNA) è stata trovata aumentata di quattro volte in pazienti asmatici, di tre volte in fumatori e di due volte in soggetti affetti da ostruzione polmonare cronica (COPD) rispetto ad individui non fumatori sani (Bai et al., 1995), a ulteriore conferma del ruolo di NKA nella broncocostrizione..

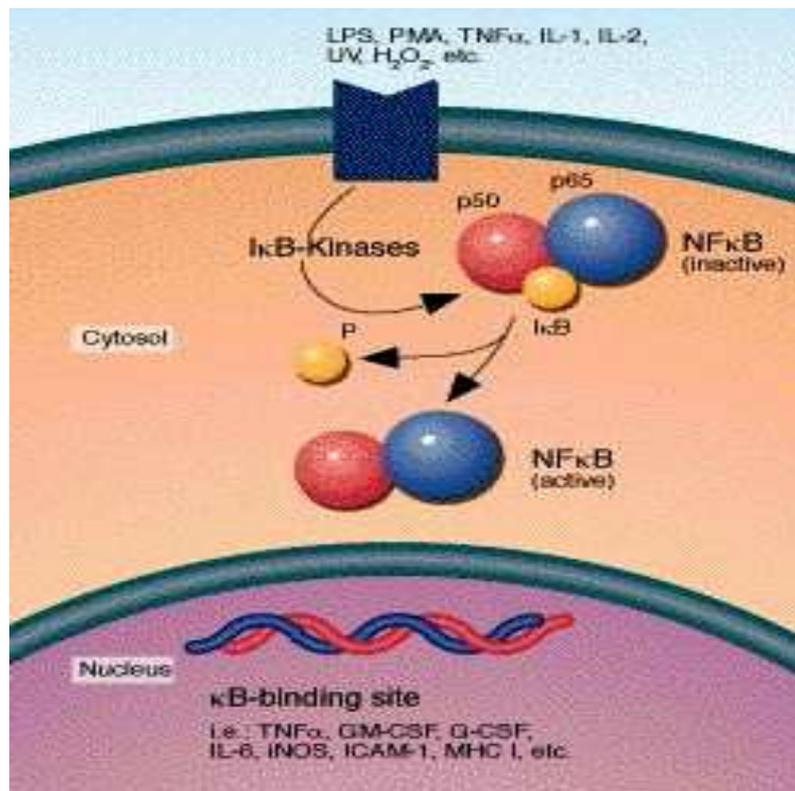
I macrofagi alveolari (AM), la popolazione cellulare predominante nei BAL, derivano in larga misura da monociti circolanti: rappresentano una "prima linea" di difesa contro gli agenti patogeni inalati e giocano un ruolo importante nei processi flogistico-immunitari locali che sottendono svariate condizioni patologiche a livello polmonare. Oltre a fagocitare il materiale corpuscolato, queste cellule, una volta attivate, liberano nello spazio extracellulare enzimi lisosomiali, metaboliti dell'acido arachidonico, citochine, radicali liberi dell'ossigeno etc. che contribuiscono a determinare la risposta tissutale all'agente patogeno. Trovandosi in un ambiente molto ricco di ossigeno, gli AM presentano una attività respiratoria a riposo più intensa di altri leucociti: circa 3 volte quella dei monociti e un ordine di grandezza in più rispetto ai granulociti neutrofili (Brunelleschi et al., 1998). Il loro metabolismo ossidativo, variabile in base al loro stato di attivazione, porta alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno, primo fra tutti, l'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). L'enzima chiave di questa via metabolica è la NADPH-ossidasi, enzima in grado di trasferire elettroni dal NADPH all'ossigeno molecolare, con produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Precedenti osservazioni del Laboratorio di Farmacologia documentano che monociti e AM di donatore sano o di paziente, cimentati in vitro con tachichinine, producono significative quantità di radicali liberi dell'ossigeno (Brunelleschi et al., 1996, 2000).

Inoltre, differenti osservazioni sperimentali, effettuate con utilizzo di antagonisti selettivi del recettore NK<sub>1</sub> (Pothoulakis et al., 1994; Stucchi et al., 2000) o topi *knock-out* per questo recettore (Bozic et al., 1996; Bhatia et al., 1998), dimostrano che il legame della SP al recettore NK<sub>1</sub> media risposte infiammatorie che coinvolgono, tra gli altri, il fattore nucleare κB (NF-κB) e MAP chinasi (Lieb et al., 1997; Castagliuolo et al., 1997; Fiebich et al., 2000).

La presenza di recettori  $NK_1$  in monociti e macrofagi è stata dimostrata sia valutando gli effetti di agonisti ed antagonisti selettivi su specifici parametri funzionali (Brunelleschi et al., 1998), sia mediante tecniche di biologia molecolare e di biochimica. Tecniche di *ibridazione in situ* e di RT-PCR sono state utilizzate per identificare l'mRNA di  $NK_1$  in monociti e macrofagi (Ho et al., 1996) ma poco si sa della sua espressione a livello di proteina. La sua espressione come proteina è stata dimostrata da Marriott e Bost (2000) e Simeonidis e altri (2003) in cellule THP-1, una linea cellulare murina di macrofagi peritoneali. Inoltre Simeonidis et al. (2003) hanno evidenziato che l'espressione del recettore  $NK_1$  in cellule THP-1 è aumentata dopo esposizione ad  $IL-1\beta$  e  $TNF-\alpha$ , effetto, quest'ultimo, in parte mediato dal fattore di trascrizione  $NF-\kappa B$ , che lega il promotore del gene  $NK_1$ , regolandolo.

Il fattore di trascrizione  $NF-\kappa B$  è un importante regolatore della risposta immunitaria ed infiammatoria nelle cellule di mammifero (Thanos et al., 1995; Ghosh et al., 2002). E' costituito da cinque subunità:  $NF-\kappa B1$  (p105-p50),  $NF-\kappa B2$  (p100-p52), RelA (p65), RelB e cRel, dove p105 e p100 sono i precursori di p50 e p52, rispettivamente. Tutti questi fattori contengono una sequenza omologa conservata, il "dominio di omologia Rel" (RHD), che contiene un dominio di legame per il DNA, un dominio di dimerizzazione ed un segnale di localizzazione nucleare.

Come noto, in assenza di stimoli adeguati,  $NF-\kappa B$  è localizzato, in forma inattiva, nel citoplasma, ancorato ad una proteina inibitrice, I $\kappa$ B (di cui esistono differenti isoforme, tra cui I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$  sono le meglio caratterizzate).  $NF-\kappa B$  può essere attivato da svariati stimoli, inclusi prodotti batterici (LPS), proteine virali, citochine infiammatorie, fattori di crescita, radiazioni, stress ossidativi etc.



I meccanismi molecolari coinvolti in tale attivazione sono meglio precisati nel caso di recettori di membrana per le citochine, quali  $IL-1$  e  $TNF-\alpha$ . In breve, la stimolazione di questi recettori innesca una cascata di eventi che determinano l'attivazione di IKK (proteinchinasi specifica per le I $\kappa$ B), che fosforila I $\kappa$ B a livello delle serine 32 e 36. Queste fosforilazioni promuovono la poliubiquitinazione di I $\kappa$ B e la sua rapida degradazione. Liberato dall'inibitore, il dimero  $NF-\kappa B$  può migrare nel nucleo dove, legandosi alle sue specifiche sequenze di DNA, induce la trascrizione

di geni bersaglio (molti dei quali codificano per proteine importanti nella risposta infiammatoria). Sono stati individuati più di 150 geni regolati da NF- $\kappa$ B, tra cui alcuni che codificano per citochine, chemochine, molecole di adesione e fattori di crescita.

## SCOPO DEL PROGETTO

Considerato il ruolo svolto dalla SP nel sistema respiratorio, nonché l'importanza dei monocito/macrofagi, abbiamo deciso di verificare l'espressione del recettore NK<sub>1</sub> nei macrofagi alveolari (AM) isolati da BAL di pazienti con differenti affezioni polmonari e di confrontarla con quella osservata nei volontari sani, fumatori e non.

Inoltre, ci siamo proposti di valutare la funzionalità del recettore NK<sub>1</sub>, misurando la produzione di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) evocata, *in vitro*, dalla SP e da agonisti selettivi per il recettore NK<sub>1</sub>, quali [Sar<sup>9</sup>Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP e Pro<sup>9</sup>SP, e di confrontarla con quella indotta da stimoli standard, ad es. forbole miristato acetato (PMA), un potente attivatore della protein chinasi C, e l'endotossina batterica LPS. Infine, considerato che l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> funziona anche da regolatore di fattori di trascrizione, ci siamo proposti di valutare l'attivazione, o meno, del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.

## MODELLI SPERIMENTALI E METODICHE

I modelli sperimentali utilizzati sono rappresentati dai macrofagi alveolari (AM), isolati dal liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti e volontari sani, e da una linea macrofagica murina, le cellule J774.A1.

I BAL sono stati effettuati presso la Divisione di Fisiopatologia Respiratoria dell'Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità di Novara, previo consenso informato del paziente. Il BAL (di norma, 60 – 80 ml) viene filtrato attraverso due strati di garza sterile e centrifugato per sedimentare le cellule. Il "pellet" viene poi lavato due volte in tampone fosfato (PBS), risospeso in RPMI 1640 addizionato di siero al 5% e piastrato. Dopo due ore di adesione a 37°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>, le cellule non adese (per lo più linfociti) vengono eliminate, e gli AM adesi utilizzati per gli esperimenti. Data la scarsità dei campioni ottenuti, alcuni esperimenti sono stati effettuati su macrofagi ottenuti per differenziamento dai monociti (MDM: monocyte-derived macrophages) di donatore sano o di paziente, secondo una procedura sperimentale largamente utilizzata nel laboratorio di Farmacologia.

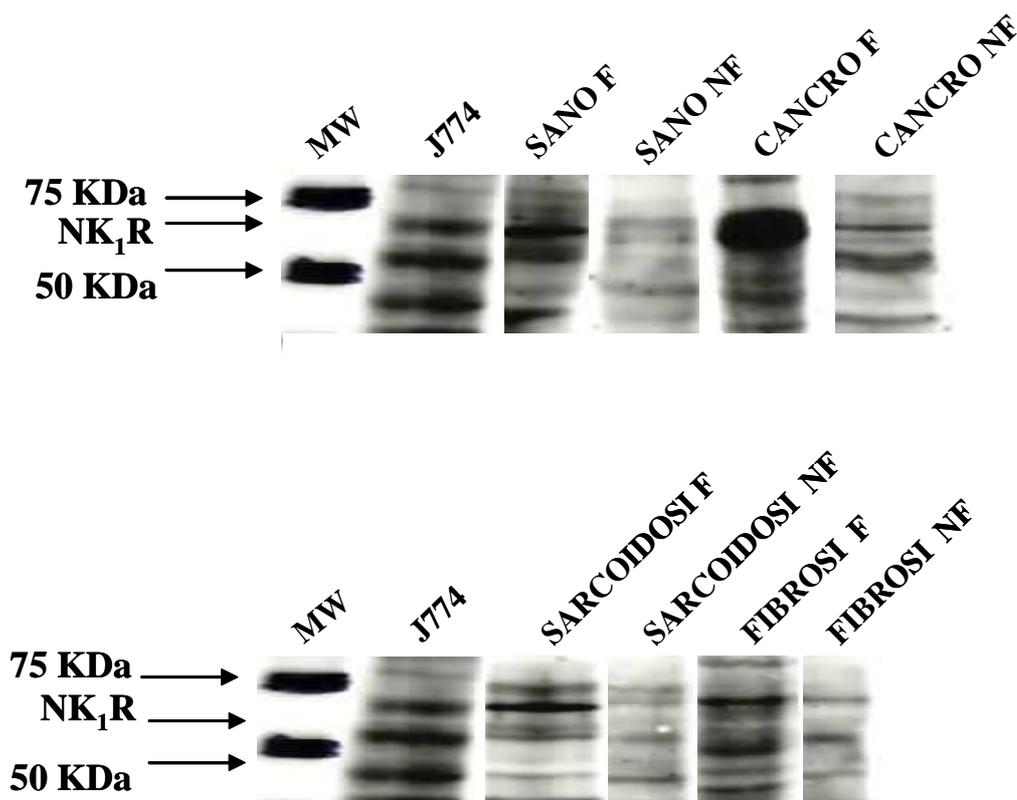
La valutazione dell'espressione del recettore NK<sub>1</sub> è stata condotta con metodologie di immunoblotting e immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo policlonale commerciale (Santa Cruz), che riconosce la regione C-terminale del recettore. Gli esperimenti di Western blotting sono condotti su estratti proteici totali di AM e di cellule J774.A1: l'anticorpo utilizzato, in accordo a quanto dichiarato dalla casa produttrice, riconosce una banda da 68 kDa.

La produzione di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), valutata spettrofotometricamente a 550 nm misurando la riduzione superossido-dismutasi (SOD) sensibile del citocromo C presente nel "medium" di incubazione, è stata espressa in nmoli di citocromo C ridotto/10<sup>6</sup> cellule/30 min., usando un coefficiente di estinzione di 2.1 x 10<sup>-4</sup> M min<sup>-1</sup> (Brunelleschi et al., 1998). Per evitare interferenza nella lettura spettrofotometrica, gli esperimenti vengono condotti in RPMI 1640 senza rosso fenolo.

Infine la valutazione del fattore NF- $\kappa$ B attivato e, quindi, traslocato nel nucleo viene condotta mediante "electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) utilizzando l'oligonucleotide *consensus* per NF- $\kappa$ B e gli estratti nucleari delle cellule opportunamente stimulate.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Abbiamo valutato l'espressione del recettore NK<sub>1</sub> sia nella linea macrofagica murina (J774.A1) che negli AM isolati da pazienti affetti da varie patologie polmonari e da donatori sani, fumatori e non. Come riportato in Fig. 1, gli esperimenti di Western blotting effettuati con l'anticorpo policlonale anti-NK<sub>1</sub> commerciale, rivelano tre bande, a 68 kDa, 53 e 42 kDa. Secondo le indicazioni della Ditta produttrice, l'anticorpo da noi utilizzato riconosce una proteina di circa 68 kDa. Come noto dalla letteratura, i recettori NK<sub>1</sub> presentano differenti siti per acetilazione e fosforilazione e possono essere presenti come forme tronche (Li et al., 1997; Page e Bell, 2002; Caberlotto et al., 2003). Nei nostri esperimenti, si può osservare una banda più o meno marcata a circa 68 kDa, per il recettore NK<sub>1</sub> (come indicato dalla Ditta produttrice) e due bande, più o meno espresse, di 53 kDa e 42 kDa. Va inoltre ricordato che, utilizzando anticorpi monoclonali non commerciali, differenti gruppi hanno identificato, in differenti tessuti, umani e non, una proteina di 46 kDa (nello stomaco umano: Smith et al., 2000), di 53 kDa (nelle cellule THP-1, una linea monocito/macrofagica; Simeonidis et al., 2003) o di 42 kDa (nei macrofagi peritoneali murini; Marriott e Bost, 2000). Pur con tutte le cautele del caso e in attesa di verificare il dato con utilizzo di un anticorpo monoclonale (non commerciale, in arrivo), queste osservazioni ci sembrano indicative della presenza di recettori NK<sub>1</sub> (valutati come proteina – il dato non è presente in letteratura) nei AM. Inoltre, la banda a 68 kDa è decisamente più intensa nei fumatori, rispetto ai non fumatori, ed è particolarmente presente nei fumatori con cancro (Figura 1). Questo suggerisce che l'espressione del recettore NK<sub>1</sub> possa essere potenziata dal fumo di sigaretta..

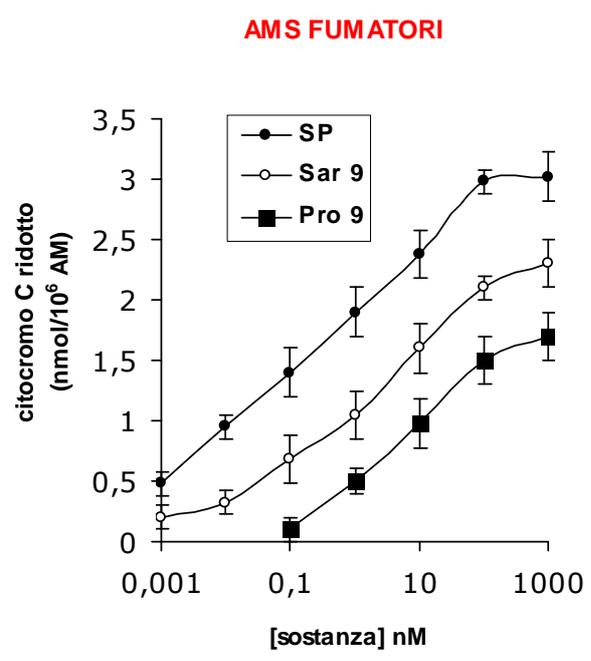


*Fig. 1: Western blotting anti-NK<sub>1</sub>R su estratti proteici totali di AM da pazienti fumatori (F) e non fumatori (NF) e da pazienti con differenti patologie respiratorie.*

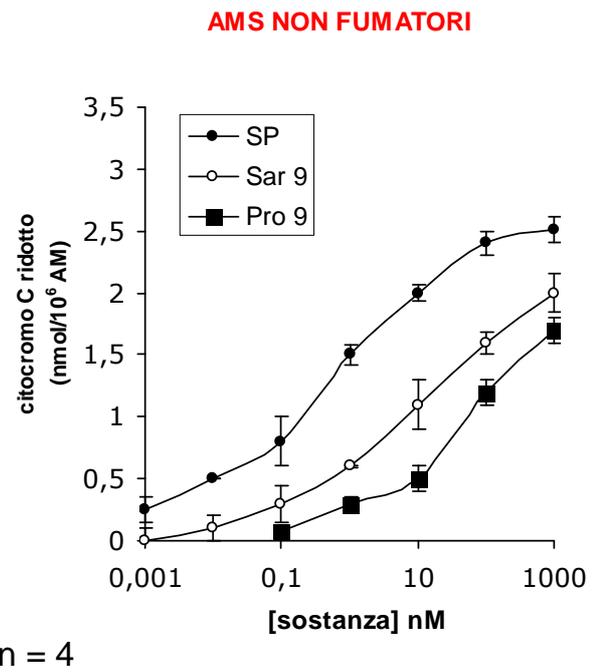
Nelle cellule di linea J774.A1 sono state riscontrate oltre alla banda a 68 kDa altre due bande una a 53 kDa ed una a 45 KDa. Tali osservazioni sono in accordo con quanto osservato da altri autori, che

La presenza del recettore è stata indagata nella linea cellulare J774.A1 anche mediante immunofluorescenza, con utilizzo dello stesso anticorpo impiegato in Western blotting. Questi esperimenti dimostrano che il recettore NK1 è prevalentemente localizzato a livello della membrana cellulare. L'analisi funzionale del recettore è stata fatta valutando la capacità della SP e di agonisti selettivi del recettore NK<sub>1</sub> di indurre la produzione di anione superossido in AM provenienti da pazienti fumatori e non fumatori

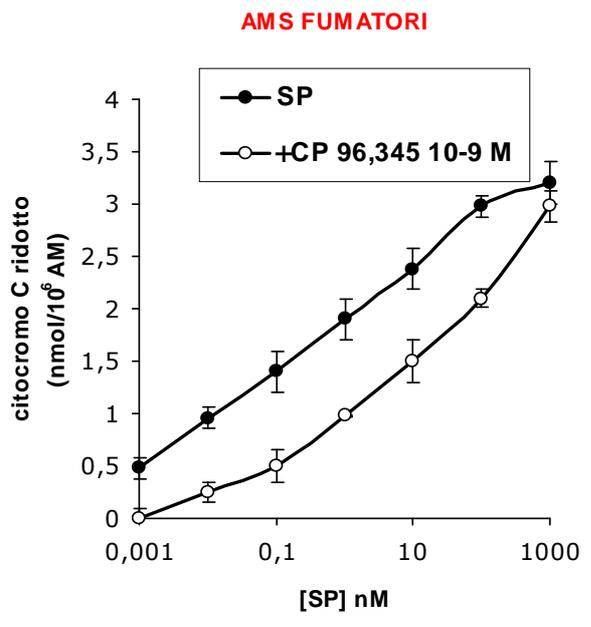
A)



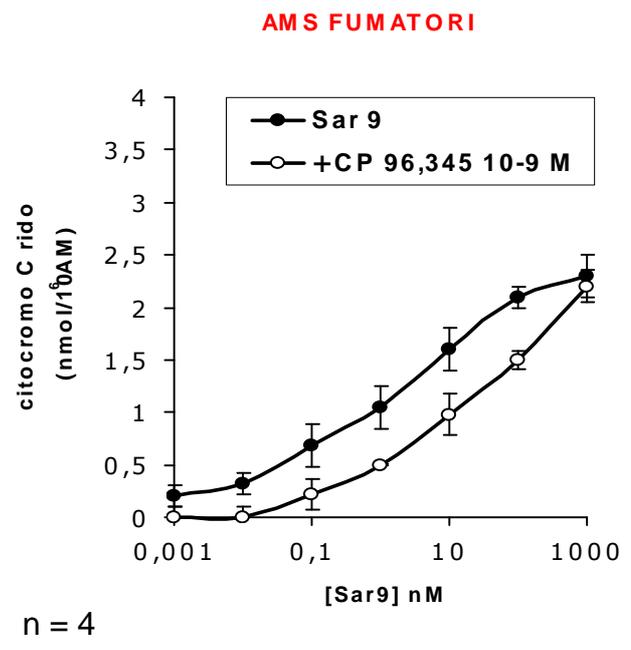
B)



C)



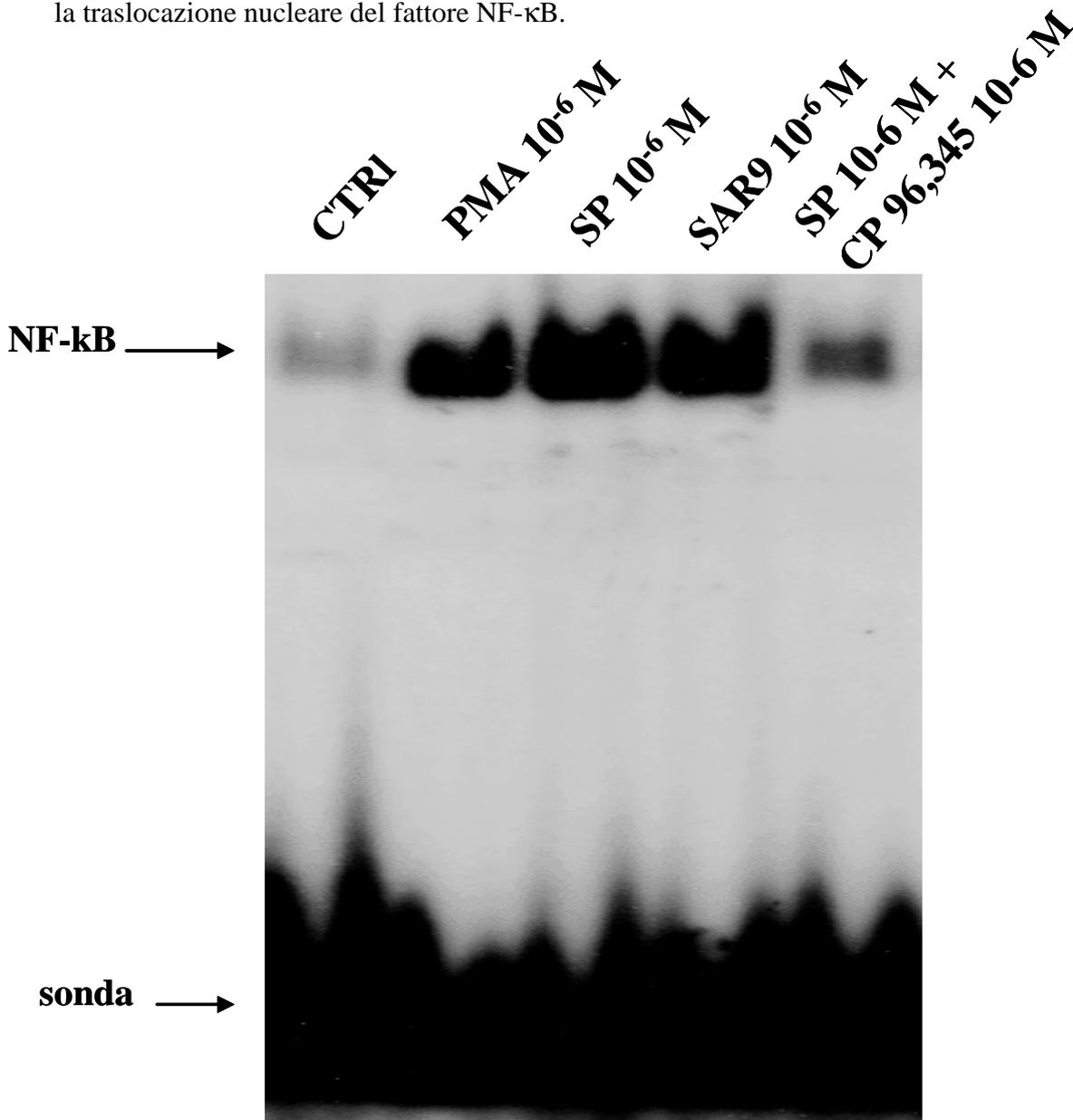
D)



**Fig. 2:** A) e B): Produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> in AM stimolati di soggetti fumatori e non fumatori;  
 C) e D): Produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> in AM di fumatori: effetto dell'antagonista specifico per NK<sub>1</sub>R

Come riportato nella Figura 2, la SP induce, in maniera dose-dipendente ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M), la produzione di  $O_2^-$ , sia nei fumatori che nei non fumatori, una più elevata produzione essendo osservata nei fumatori. Come ampiamente documentato in letteratura, AM di fumatori producono spontaneamente elevate quantità di  $O_2^-$  (circa 13 nmoli citocromo C ridotto /  $10^6$  AM) rispetto ai non fumatori (circa 0.8 nmoli citocromo C ridotto /  $10^6$  AM): questi valori di produzione basale sono stati sottratti da tutte le determinazioni con gli stimoli. Gli agonisti selettivi  $NK_1$ ,  $[Sar^9Met(O_2)^{11}]SP$  e  $Pro^9SP$ , nell'intervallo di concentrazione  $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M, pur meno potenti di SP, inducono un significativo "burst" respiratorio, sia nel fumatore che nel non fumatore (Figura 2, A e B). Inoltre, gli effetti della SP e degli agonisti selettivi sono competitivamente antagonizzati da CP 96,345, qui utilizzato alla concentrazione di 1 nM, antagonista selettivo non peptidico del recettore  $NK_1$  (Figura 2, C e D).

Infine è stata valutata, mediante EMSA, la capacità della SP e dell'agonista selettivo  $NK_1$  di indurre la traslocazione nucleare del fattore NF- $\kappa B$ .



**Fig. 3:** EMSA di NF- $\kappa B$  nucleare in lisati nucleari di MDM trattati con differenti stimoli e con l'antagonista CP 96,345.

In questi esperimenti, che richiedono un elevato numero di cellule (circa  $5 \times 10^6$  per campione),

abbiamo utilizzato MDM e non AM, per il fatto che non abbiamo avuto sufficiente materiale per farlo. In ogni caso gli MDM, in quanto anch'essi macrofagi derivanti da monociti circolanti, dovrebbero mimare quanto accade negli AM.

Come si può osservare nella Figura 3, il PMA, utilizzato a  $10^{-6}$ M come stimolo di riferimento (essendo la sua capacità di indurre l'attivazione di NF-kB assai ben documentata in differenti modelli cellulari), induce una importante traslocazione nucleare del fattore NF-kB. La SP, qui utilizzata a  $10^{-6}$ M, si dimostra ancora più efficace di PMA. L'agonista selettivo del recettore NK<sub>1</sub> riproduce gli effetti della SP. La capacità dell'antagonista selettivo CP96,345 di revertire l'attivazione del fattore NF-kB indotta da SP (Figura 3) rappresenta una ulteriore conferma del fatto che, a livello macrofagico, le azioni della SP sono mediate dalla sua interazione con recettori NK<sub>1</sub>.

## BIBLIOGRAFIA

- Bai et al., 1995, *Am. J. Physiol.* 269, L309-L317.  
Bhatia et al., 1998, *PNAS* 95, 4760-4765.  
Baluk et al., 1995, *Am. J. Physiol.* 268, L263  
Bowden et al., 1994, *PNAS* 91, 8964-8968.  
Bozic et al., 1996, *Science* 273, 1722-1725.  
Brunelleschi et al., 1991, *Life Sci.* 48, PL1-PL5.  
Brunelleschi et al., 1996 *Neuropeptides* 30(5), 456-464.  
Brunelleschi et al., 1998, *Neuropeptides* 32, 215-223.  
Brunelleschi et al., 2000, *Neuropeptides* 34(1), 45-50.  
Caberlotto et al., 2003, *Eur. J. Neurosci.*, 17(9):1736-1746.  
Carlton et al., 2002, *Neurosci. Lett.* 326, 29-32.  
Castagliuolo et al., 1997, *PNAS* 94, 4788-4793.  
Chu et al., 2000, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 713-722.  
Cook et al., 1994, *J. Immunol.* 152, 1830-1835.  
Dalsgaard et al., 1985, *Histochemistry* 83, 37-39.  
Douglas et al., 1982, *Brain Res.* 245, 376-378  
Dusser et al., 1989, *J. Appl. Physiol.* 67, 1504-1511.  
Erspamer et al., 1981, *Peptides* 2, 7-16.  
Fiebich et al., 2000, *J. Immunol.* 165, 5606-5611.  
Ghosh et al., 2002, *Cell* 109, Suppl., S81-S96.  
Helke et al., 1990, *Faseb J.* 4, 1606-1615.  
Hinman et al., 1979, *Science* 205, 202-203.  
Ho et al., 1996, *J. Neuroimmunol.* 71, 73-80.  
Ishigooka et al., 2001, *Pain* 93, 43-50.  
Iwamoto et al., 1993, *Regul. Pept.* 46, 228-230.  
Kanazawa and Jessell, 1976, *Brain Res.* 117, 362-367.  
Kanazawa et al., 1984, *Neurosci Res.* 2, 111-120.  
Lavagno et al., 2001, *Neuropeptides* 35, 92-99.  
Li et al., 1997, *PNAS* 94, 9475-9480.  
Lieb et al., 1997, *J. Immunol.* 159, 4952-4958.  
Lotz et al., 1988, *Science* 241, 1218-1221.  
Maggi et al., 1987, *Eur. J. Pharmacol.* 136, 189-205.  
Maggi CA, 1997, *Regul. Pept.* 70, 75-90.  
Manzini et al., 1989, *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 936-941.  
Marriott e Bost, 2000, *J. Neuroimmunol.* 102, 163-171.

Merchenthaler et al., 1992, Peptides 13, 815-829.  
Mousli et al., 1989, J. Pharmac. Exp. Ther. 250, 329-335.  
Nakanishi S , 1987, Physiol. Rev. 67, 1117-1142.  
Nawa et al., 1984, Nature 312, 729-734.  
Nilsson et al., 1977, Substance P, pp 75-82, Raven Press,New York.  
Ogawa et al., 1985, Brain Res. 359, 152-157.  
Page e Bell, 2002, Eur. J. Pharmacol. 15, 437(1-2), 27-30.  
Pascual et al., 1991, J. Immunol. 146, 2130-2136.  
Payan et al., 1983, J. Immunol. 131,1613-1615.  
Pernow , 1983, Pharmacol. Rev. 35, 85-141.  
Pothoulakis et al., 1994, PNAS 91, 947-951.  
Regoli et al., Receptors and antagonist for substance P and related peptides. Pharmacology,1994,  
Saban et al., 1987, Am. Rev. Respir. Dis. 136, 586-591.  
Schafer et al., 1993, NeuroReport 4, 1007-1010  
Severini et al., 2002, Pharmacol. Rev. 54, 285-322.  
Sharkey et al., 1983, Neuroscience 10, 861-868.  
Simeonidis et al., 2003, PNAS 100, 2957-2962.  
Smith et al., 2000, J. Autonom. Nerv. Syst. 79, 165-172.  
Stucchi et al., 2000, Am. J. Physiol. 279, G1298-G1306.  
Takeyama et al., 1996, Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. 13, 33-37  
Thanos et al., 1995, Cell 80, 529-532.  
Tomaki et al., 1995, Am J Respir Crit Care Med. 151(3 Pt 1), 613-617  
Trippe et al., 2000, J. Virol. 74,1614-1622.  
Uchida et al., 1987, Am. Rev. Respir. Dis. 136, 718-721.  
Yamawaki et al., 1995, J.Appl. Physiol. 79, 398-404.