

MARIANA LIMA VALE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA
TALIDOMIDA, PENTOXIFILINA E CLORPROMAZINA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queirós Cunha.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

FORTALEZA
2003

V243a Vale, Mariana Lima

Avaliação da Atividade Antinociceptiva da Talidomida, Pentoxifilina e Clorpromazina em Modelos Experimentais / Mariana Lima Vale – Fortaleza, 2003.

193f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Dor (inflamação). 2. Talidomida. 3. Pentoxifilina
4. Clorpromazina. I. Título

CDD 616.0473

Os filhos

(Gibran Kahlil)

“Teus filhos não são teus filhos”.
São filhos e filhas da ânsia da vida por si mesma.
Vêm através de ti, mas não de ti,
E embora estejam contigo, a ti não pertencem.
Podes dar-lhes teu amor, mas não teus
pensamentos,
Pois eles têm seus pensamentos próprios.
Podes abrigar seus corpos, mas não suas almas,
Pois suas almas residem na casa do amanhã,
Que não podes visitar sequer em sonhos.
Podes esforçar-te por te parecer com eles,
Mas não procures fazê-los semelhante a ti.
Pois a vida não recua, e não se retarda no ontem.
Tu és o arco do qual teus filhos, como flechas
vivas,
São disparados.

.....
Que a tua inclinação, na mão do arqueiro,
Seja para a alegria
Pois, assim como ELE ama a flecha que voa,
Também ama o arco que permanece estável!”.

Aos meus pais e à minha querida Marina

Agradecimentos

Ao Meu orientador Prof. Ronaldo Ribeiro pela confiança e incentivo durante todos esses anos e principalmente pelo exemplo de caráter e amor ao que faz.

Ao Prof. Fernando Cunha pela co-orientação, pelo apoio e gentileza em todos os momentos e por ter me recebido e cooperado para a realização deste trabalho.

À profa. Gerly Anne por sua delicadeza e paciência diante das minhas dúvidas e por ter contribuído na parte final deste trabalho.

Ao Prof. Aírton Rocha pelas críticas e sugestões recebidas e pelas lições aprendidas.

À Dani Sachs pela participação direta na parte experimental e pela amizade

À Verônica Benevides pela ajuda na parte experimental

À Raquel Montenegro pela ajuda com a imunohistoquímica

Ao Prof. Vietla S. Rao por ter cedido o aparelho de placa quente

Aos colegas da pós-graduação: Virgínia, Mirlane, Mila, Silvia Bona, Adriana, Vilma, Renata, Mirna, Rondinelli, Marcio Uetti, Ingrid, Antoniaela, Rosemary, Helliada, Milena, Carlos Rocha, Antero, Ana Paula e a todos os colegas do laboratório que me proporcionaram um ambiente alegre e descontraído para trabalhar.

À nossa técnica Vandinha pela dedicação ao laboratório e pela preciosa ajuda em todos os momentos.

Aos Funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Rose, Joana, Marta, Fernando, Chiquinho, Íris pela disposição em sempre me atender.

Ao Ivan do Departamento de Morfologia pelos cortes histológicos

Às secretárias da Pós-graduação em Farmacologia: Sílvia e Áurea pela ajuda com as questões burocráticas.

Aos Técnicos do laboratório de inflamação e dor do Departamento de Farmacologia – FMRP – USP: Sergio Rosa (Serginho), Ieda, Giuliana, Kátia, Fabíola.

À Dra. Artemísia pela atenção a mim concedida nas solicitações de animais no biotério.

Ao Christian e Caio pela ajuda com o computador

Ao CNPq pelo apoio financeiro

**“Nenhum tempo é tempo bastante para a
ciência do ver e rever.”**

Carlos Drummond de Andrade

ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

AAc	ácido acético
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BK	bradicinina
BK ₁	receptor do tipo B ₁ da bradicinina
BK ₂	receptor do tipo B ₁ da bradicinina
Ca ⁺⁺	íon de cálcio
Cg	Carragenina
CINC-1	Quimioatratante para neutrófilos induzido por citocina
C5a	Quinto componente do sistema complemento ativado
CLP	clorpromazina
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase constitutiva
COX-2	ciclooxigenase induzida
D ₁	receptor do tipo D ₁ da dopamina
Db-GMPc	dibutiril guanosina monofosfato cíclico
ENL	Eritema Nodoso da Lepra
EPM	erro padrão da média
g	grama
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulados de colônia de granulócitos e macrófagos
GMP-c	Guanosina monofosfato cíclico

H ₁	Receptor da histamina tipo H ₁
H ₂	Receptor da histamina tipo H ₂
HOE-140	([D-Arg ¹ , Thi ⁶ , (1,2,3,4-tetrahydroisoquilonin-2-yl-arbonyl) ⁸ , ((3as,7as)-octahydroindol-2-yl-carbonyl)9]bradykinin
IASP	International Association for the Study of Pain
IFN	interferon
IFN-(interferon-alfa
IFN-(interferon-gama
IgE	anticorpo IgE
IL-1	Interleucina-1
IL-1ra	antagonistas do receptor para IL-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
ILO	iloprost
Kda	Quilodalton (s)
kg	Kilograma (s)
l	Litro
L-NAME	L-NG-nitro arginine methyl ester ,
LPS	Lipopolissacarídeo de bactéria
LTB4	Leucotrieno B4

LTC4	Leucotrieno C4
MCAF	fator ativador e quimiotáxico para monócito,
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
mg	miligrama (s)
min	minuto (s)
ml	mililitro
mm	milímetros
MNF	Fator nociceptivo secretado por macrófagos
Nº	Número
ng	Nanograma (s)
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
NOSi	enzima óxido nítrico sintase induzida
NOSc	enzima óxido nítrico sintase constitutiva
PBS	Solução salina tamponada
PGI2	Prostaciclina
PGE2	Prostaglandina E2
Pkc	Proteína-quinase-C
PM	peso molecular
PTX	pentoxifilina
Rhu	Recombinante humana
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	Meio de cultura RPMI
s.c.	Subcutâneo

Th2	linfócitos T helper 2
TALD	talidomida
Tg	Tioglicolato
TGF	..Fator transformador de crescimento
TNF	..Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
sTNFR1	receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral
sTNFR2	receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral
UI	.Unidade (s) internacional (is)
v/v	volume por volume
Zym	Zymosan
(alfa
(beta
(Gama
(g	Micrograma
(l	Microlitro
°C	Graus Célsius
<	menor

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1.1. A redução da população de células residentes diminui significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético mas não a do Iloprost (ILO).....	16
Ilustração 1.2. O pré-tratamento com tioglicolato aumenta significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético mas não a do Iloprost (ILO).	16
Ilustração 1.3. IMediadores Inflamatórios liberados por mastócitos ativados....	17
Ilustração 1.4. O pré-tratamento crônico com o composto 48/80 diminui significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético, mas não a do iloprost (ILO).....	17
Ilustração 1.5. Efeito antinociceptivo da IL-4, IL-10 e IL-13 sobre as contorções abdominais e incapacitação articular induzida por zymosan (ZYM).	26
Ilustração 1.6. Efeito amplificador dos anticorpos específicos contra IL-4, IL-10 e IL-13 sobre a nocicepção induzida por zymosan nos modelos de contorções abdominais e incapacitação articular.	26
Ilustração 1.7. Fator de necrose tumoral (TNF) e a sinalização através dos subtipos de receptores TNFR1 e TNFR2 (receptor para o TNF tipo 1 e 2).....	45
Ilustração 2.1. Teste de contorção abdominal em camundongos induzido por zymosan, ácido acético ou iloprost.....	64
Ilustração 2.2. Teste de incapacitação articular em joelho de rato induzido por zymosan.....	65
.....	
Ilustração 2.3. Teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-	

Selitto modificado por Ferreira e Cols., 1978) induzida por diversos 66
estímulos.

Ilustração 2.4. Teste da placa quente em 67
camundongos.....

Ilustração 2.5. Obtenção do sobrenadante de cultura de células 68
peritoneais estimuladas in vivo com
zymosan.....

Ilustração 2.6. Obtenção do sobrenadante do lavado articular da cavidade 69
articular de joelho ratos estimulados com
zymosan.....

Ilustração 2.7. Obtenção de peças histológicas para realização do ensaio 70
de
imunohistoquímica.....
.....

FIGURA 1. Efeito antinociceptivo da talidomida nas contorções abdominais 73
induzidas por ácido acético ou zymosan.
.....

FIGURA 2. Efeito antinociceptivo da talidomida sobre a incapacitação 74
articular induzida por
zymosan.....

FIGURA 3. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a 75
intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por
carragenina.....

FIGURA 4. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a 76
intensidade de edema induzido por carragenina.
.....

FIGURA 5. Efeito do pós-tratamento com talidomida sobre a intensidade 77
de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina.
.....

FIGURA 6. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a 79
intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina,
fator de necrose tumoral, ou prostaglandina E_2 .
.....

- FIGURA 7** Efeito dos anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 no efeito anti-hiperalgésico da talidomida. 80
- FIGURA 8.** Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da talidomida e morfina nas contorções abdominais induzidas por zymosan..... 81
- FIGURA 9.** Efeito da talidomida sobre o tempo de reação no teste da placa quente. 83
- FIGURA 10.** Efeito da talidomida na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas *in vivo* com zymosan. 84
- FIGURA.11.** Efeito da talidomida sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. 85
- FIGURA 12.** Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre o nível de RNAm para TNF *in vivo* de células colhidas da cavidade peritoneal de camundongos injetados com zymosan. 87
- FIGURA 13.** Tratamento com talidomida reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com carragenina..... 88
- FIGURA 14.** Efeito antinociceptivo da pentoxifilina nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan. 90
- FIGURA 15.** Efeito da pentoxifilina abdominais induzidas por zymosan (0.5 mg/animal) ou iloprost (0.5 mg/animal). 91
- FIGURA 16.** Efeito antinociceptivo da pentoxifilina sobre a incapacitação

articular induzida por zymosan. 92

.....

FIGURA 17. Efeito da administração sistêmica de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. 94

.....

FIGURA 18. Efeito da administração local de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. 95

.....

FIGURA 19. Efeito do pós-tratamento com pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. 96

.....

FIGURA 20. Efeito da administração local de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral, interleucina-1 ou prostaglandina E₂. 97

.....

FIGURA 21. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da pentoxifilina e morfina nas contorções abdominais induzidas por zymosan. 99

.....

FIGURA 22. Efeito da pentoxifilina sobre o tempo de reação no teste da placa quente. 100

.....

FIGURA 23. Efeito da pentoxifilina na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas in vivo com zymosan. 101

.....

FIGURA 24. Efeito da pentoxifilina sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. 103

.....

Figura 25. Tratamento com pentoxifilina reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com 104

carragenina.....	
FIGURA 26. Efeito antinociceptivo da clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan.	10 6
FIGURA 27. Efeito da clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por iloprost.	10 7
FIGURA 28. Efeito antinociceptivo da clorpromazina sobre a incapacitação articular induzida por zymosan.	10 8
FIGURA 29. Efeito da administração sistêmica de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina.	11 0
FIGURA 30. Efeito da administração local de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina.	11 1
FIGURA 31. Efeito do pós-tratamento com clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina.	11 2
FIGURA 32. Efeito da administração sistêmica de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral, interleucina-1 ou prostaglandina E ₂	11 3
FIGURA 33. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da clorpromazina e morfina nas contorções abdominais induzidas por zymosan....	11 5
FIGURA 34. Efeito da clorpromazina sobre o tempo de reação no teste da placa quente.	11 6
FIGURA 35. Efeito da clorpromazina na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas <i>in vivo</i> com zymosan.....	11 7

FIGURA 36. Efeito da clorpromazina sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. 11
9

.....

FIGURA 37. Tratamento com clorpromazina reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com carragenina. 12
0

.....

RESUMO

Avaliação da Atividade Antinociceptiva da Talidomida, Pentoxifilina e Clorpromazina em Modelos Experimentais. Mariana Lima Vale, Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de Queirós Cunha, Fortaleza, 2003.

Já está estabelecido que a liberação de produtos da ciclooxigenase e aminas simpatomiméticas, medidores finais da hiperalgesia inflamatória é precedido pela geração de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e nociceptivas. Dados anteriores demonstraram que a ativação desta cascata de citocinas é dependente também da presença de células residentes como macrófagos e mastócitos no local da injúria. Talidomida (TALD), pentoxifilina (PTX) e clorpromazina (CLP) são drogas que dentre outras funções são descritas como imunomoduladoras por modularem a produção de algumas citocinas e vem chamando atenção pelas suas propriedades

antiinflamatórias na prática clínica e em modelos experimentais. Com base nesses achados, o objetivo do presente trabalho foi estudar uma possível atividade antinociceptiva de TALD, PTX e CLP correlacionando à essa atividade imunomodulatória. Para tanto injetou-se por via i.p. talidomida (TALD; 5-45 mg/kg), pentoxifilina (PTX; 0.5 – 45 mg/kg) ou clorpromazina (CLP; 0.1 – 1 mg/kg) 30 min antes da administração de ácido acético (AAc), zymosan (Zym) ou iloprost (ILO) para o teste de contorções abdominais em camundongos (CA), ou 30 min antes do Zym intrarticular no teste da incapacitação articular (IA) em joelho de rato (teste de nocicepção articular). TALD, PTX e CLP também foram testadas em diferentes doses por via sistêmica (i.p.) ou local (intraplantar) no teste da hiperalgesia (HYP) mecânica induzida por carragenina (Cg), bradicinina (Bk), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou prostaglandina E₂ (PGE₂) e no teste da placa quente (PQ). TALD, PTX ou CLP também foi injetada em camundongos 30 min antes do zymosan e após 15 min foi feita a coleta do fluido peritoneal contendo células residentes onde o mesmo foi posto bem cultura para avaliar a produção de citocinas por essas células. O fluido articular de ratos tratados com TALD, PTX ou CLP e estimulados com Zym intrarticular também foi analisado no mesmo sentido. Nossos resultados demonstram que TALD, PTX e CLP são antinociceptivas tanto no modelo de CA induzidas por zymosan (85.6, 82.9 e 63.7% de inibição, respectivamente, $p < 0.001$) ou AAc (60.3, 89.8 e 89% de inibição, efeito máximo respectivamente, $p < 0.001$), como também a IA induzida por Zym (75, 89 e 99% de inibição, respectivamente, $p < 0.001$), mas não nas CA induzidas por ILO. TALD foi capaz de inibir o efeito hiperalgésico da Cg (78.6%) e Bk (82.4%), mas não o de TNF e PGE₂. PTX inibiu a HYP induzida por Cg (73.3%), Bk (55.2%), TNF (45.6%), mas não a por IL-1 ou PGE₂. CLP inibiu a HYP induzida por todos os estímulos, mas em graus diferentes (68.16, 58.5, 42, 38.8 e 21.1% de inibição respectivamente para Cg, Bk, TNF, IL-1 e PGE₂). Estes efeitos antinociceptivos parecem ser de domínio periférico visto que as drogas não modificaram o tempo de reação na PQ e não dependem da liberação de opióides endógenos, pois naloxona não reverteu a atividade antinociceptiva das drogas. Contudo a atividade antinociceptiva parece depender da inibição da liberação de citocinas pró-nociceptivas por células residentes visto que TALD, PTX e CLP inibiram a liberação de TNF (100, 85 e 54.4% de inibição respectivamente $p < 0.001$) e IL-1 (97% de inibição para PTX) por células peritoneais residentes de camundongos como também a produção de TNF (77 e 87.5% de inibição respectivamente para TALD e PTX) e IL-1 (47 e 32.6% de inibição respectivamente para PTX e CLP) na cavidade articular de ratos estimulados com Zym.

ABSTRACT

Study of the Antinociceptive activity of Thalidomide, Pentoxifylline and Chlorpromazine in Experimental Models. MARIANA LIMA VALE. Thesis submitted as partial fulfillment of requirement to degree of Doctor in Pharmacology to the post-graduation Pharmacology course of the Ceará Federal University. Supervisor: Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Co-Supervisor: Dr. Fernando de Queirós Cunha, Fortaleza 2003.

The release of cyclo-oxygenase products and sympathomimetic amines, the final mediators of inflammatory pain, is preceded by the generation of pro-inflammatory and nociceptive cytokines by resident cells. Recently drugs such as thalidomide (TALD), pentoxifylline (PTX) and chlorpromazine (CLP), despite of other effects, have been associated with immunomodulatory activity in clinical practice mainly for their modulatory properties upon cytokine production. Since those drugs are able to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and the pivotal role of resident cells in the development of inflammatory pain we have decided to test the possibility of TALD, PTX and CLP, to modulate inflammatory pain. TALD (5 – 45mg/kg), PTX (0.5 – 45mg/kg) or CLP (0.1 – 1mg/kg) was given 30 min before either acetic acid (AAc) or zymosan (Zym) or iloprost (ILO) administration in the writhing model. TALD, PTX or CLP, at the same doses were injected, i.p., 30 min before Zym (1 mg/animal; intra-articular) in the zymosan-induced rat knee joint incapacitation test (JI). Those drugs were also tested upon hyperalgesic effect of carrageenin (Cg), bradykinin (Bk), tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) -1 and prostaglandin E₂ (PGE₂) on mechanical hyperalgesia test (HYP). Doses of those drugs that exerted maximum effect in the writhing test were also injected 30 min before the hot plate test. These same doses were injected ip before naloxone administration in the AAc-induced writhing model in mice. Cytokines levels (TNF, IL-1, IL-10 and IL-4) were determined in the supernatant of a macrophage culture, which were collected from peritoneal fluid of mice treated with Zym and pre-treated with the drugs under test and in the supernatant of articular fluid of rats pre-treated with the drugs and stimulated with Zym (TNF, IL-1 β , IL-10, IL-6 and CINC-1). Our results showed that TALD, PTX and CLP inhibited the writhing response in mice induced by AAc or Zym up to 60.3, 89.8 e 89%, and up to 85.6, 82.9 and 63.7% respectively ($p < 0.001$), but not the nociceptive response to ILO. Similar results were observed in the JI induced by Zym: 75, 89 e 99% of inhibition, respectively ($p < 0.01$). TALD inhibited hyperalgesic effect of Cg (78.6%) and Bk (82.4%), but not the hyperalgesic effect of TNF or PGE₂. PTX inhibited Cg, TNF or Bk-induced HYP in 73.3, 55.2 and 45.6% of inhibition respectively, but not IL-1 or PGE₂ hyperalgesic activity. CLP inhibited a hyperalgesic effect of all stimuli in different levels (68.16, 58.5, 42, 38.8 and 21.1% of inhibition for Cg, Bk, TNF, IL-1 e PGE₂, respectively). The antinociceptive activity of TALD, PTX and CLP seems to be peripheral, since these drugs presented no effect in the reaction time of the animals on hot plate test. This antinociceptive effect seems to have no relation with endogen opioid release since naloxone (opioid receptor antagonist) had no effect in reverting the antinociceptive effect of these drugs in the Zym-induced writhing in mice. The antinociceptive activities seems to be dependent of the release inhibition of pro-nociceptive cytokines by resident cells since TALD, PTX and CLP inhibited the release of TNF (100, 85 e 54.4%, respectively - $p < 0.005$) and of IL-1 β (97%, PTX effect - $p < 0,01$) by mice peritoneal resident cells as well as the production of both TNF (77 e 87.5% by TALD and PTX respectively) and IL-1 β (47 e 32.6% by PTX and CLP, respectively) in the articular cavity of ZYM stimulates rats.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. DOR.....	2
1.1. Definição.....	2
1.2. Dor nociceptiva.....	3
1.3. Dor neuropática.....	5
1.4. Dor visceral.....	6
2. DOR INFLAMATÓRIA.....	8
2.1. Aspectos gerais.....	8
2.2. Mediadores da dor inflamatória.....	8
3. PAPEL DE CÉLULAS RESIDENTES NA GERAÇÃO DA DOR.....	12
3.1. Macrófagos.....	12
3.2. Mastócitos.....	13
4. MODULAÇÃO DA DOR POR CITOCINAS.....	18
4.1. Citocinas e indução da resposta nociceptiva.....	19
4.2. Citocinas e inibição da resposta nociceptiva.....	23
5. MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA MEDIAÇÃO DA DOR POR CITOCINAS.....	25
5.1. Talidomida.....	27
5.2. Análogos da talidomida.....	33
5.3. Pentoxifilina.....	33
5.4. Clorpromazina.....	37
5.5. Agentes Biológicos.....	41
6. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	46
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
1. ANIMAIS.....	48
1.1. Camundongos e Ratos.....	48
2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.....	48

3. DROGAS, SOLUÇÕES, CITOCINAS E ANTISOROS.....	50
3.1. Drogas.....	50
3.2. Soluções.....	51
3.3. Tampões utilizados para o ensaio imunoenzimático.....	51
3.4. Tampões e soluções e reagentes utilizados para o ensaio de imunohistoquímica.....	52
3.5. Meio de Cultura.....	52
3.6. Citocinas e Antisoros.....	53
3.6.1. Citocinas.....	53
3.6.2. Anticorpos específicos.....	53
4. TESTES NOCICEPTIVOS.....	54
4.1. Teste de contorção abdominal induzido por ácido acético ou zymosan.....	54
4.2. Teste de incapacitação articular.....	54
4.3. Teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato.....	55
4.4. Teste da placa quente.....	55
5. MÉTODOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE FLUIDOS E TECIDOS PARA ANÁLISE.....	56
5.1. Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos.....	56
5.2. Coleta do lavado articular de joelho de rato.....	56
5.3. Coleta da pele de pata de rato.....	56
6. DOSAGEM E IMUNOHISTOQUIMICA PARA A DETECÇÃO DE CITOCINAS.....	57
6.1. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófago e em sobrenadante de lavado articular.	57
6.2. Imunohistoquímica em pele de pata de rato para a detecção de TNF	58
6.3. Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT- PCR).....	59
7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	60
7.1. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, zymosan ou iloprost.	60

7.2. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a incapacitação articular induzida por zymosan.....	70
7.3. Efeito do pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a hiperalgesia mecânica em pata de rato induzida por diversos estímulos.	70
7.4. Efeito do pré-tratamento com os anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 na atividade de talidomida na hiperalgesia induzida por carragenina.....	61
7.5. Efeito da talidomida e pentoxifilina no teste da placa quente.....	61
7.6. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina ou da clorpromazina.	61
7.7. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina na liberação de diversas citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados in vivo por zymosan.	62
7.8. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre os níveis de citocinas presentes no lavado articular do joelho de ratos submetidos á artrite experimental por zymosan.....	62
7.9. Efeito do pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em pele de rato estimulada com carragenina.....	62
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
III. RESULTADOS.....	71
1. Inibição da atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético por talidomida no modelo de contorções abdominais.	72
2. Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular em joelho de rato.....	72
3. Efeito antinociceptivo da talidomida sobre a intensidade de hiperalgesia induzida por carragenina.	72
4. Efeito da talidomida sobre a intensidade de hiperalgesia induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF) ou prostaglandina E ₂ (PGE ₂).	78
5. Efeito dos anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 no efeito anti-hiperalgésico da talidomida.	78
6. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela	

injeção prévia de talidomida nas contorções abdominais induzidas por zymosan.	78
7. Efeito da talidomida sobre o tempo de reação no teste da placa quente	82
8. Efeito da talidomida na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados <i>in vivo</i> com zymosan.....	82
9. Efeito da talidomida na liberação de citocinas na cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan.....	82
10. Efeito da talidomida nos níveis de RNAm para TNF induzido , <i>in vivo</i> , por zymosan em camundongos.....	86
11. Efeito do tratamento com talidomida na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.	86
12. Efeito da pentoxifilina no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético, zymosan ou iloprost.....	89
13. Efeito da pentoxifilina sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular.....	89
14. Efeito da pentoxifilina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por carragenina.....	93
15. Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou prostaglandina e ₂ (PGE ₂).	93
16. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela injeção prévia de pentoxifilina nas contorções abdominais induzidas por zymosan.	98
17. Efeito da pentoxifilina sobre o tempo de reação no teste da placa quente	98
18. Efeito da pentoxifilina na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados <i>in vivo</i> com zymosan.....	98
19. Efeito da pentoxifilina na liberação de citocinas para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan.....	102
20. Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.....	102
21. Efeito da clorpromazina no teste de contorções abdominais induzido por	

zymosan, ácido acético ou iloprost.	105
22. Efeito do pré-tratamento com clorpromazina sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular em joelho de rato.	105
23. Efeito da clorpromazina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por carragenina.....	109
24. Efeito do pré-tratamento com clorpromazina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou prostaglandina e ₂ (PGE ₂).	109
25. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela injeção prévia de clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por zymosan.....	114
26. Efeito da clorpromazina sobre o tempo de reação no teste da placa quente.	114
27. Efeito da clorpromazina na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados in vivo com zymosan.....	114
28. Efeito da clorpromazina na liberação de citocinas para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan.....	118
29. Efeito do tratamento com clorpromazina na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.	118
IV. DISCUSSÃO.....	121
V. CONCLUSÃO.....	142
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144

I. INTRODUÇÃO

1. DOR

1.1. Definição

A dor é uma condição inerente à vida. Foi considerada no passado um fator “ofensivo” ao indivíduo; simplesmente uma fonte de sofrimento e expressão de uma punição. O pensamento moderno identifica a dor como um sinal de presença de estimulação nociceptiva, ou seja, um “defensor” que alerta para a existência de algum comprometimento da integridade física ou funcional do indivíduo, permitindo que mecanismos que propiciam prevenir ou limitar o agravamento de lesões teciduais sejam acionados. Sem a participação das unidades nociceptivas, a vida normal seria impossível. Na síndrome da insensibilidade congênita à dor, a não percepção da ocorrência das lesões teciduais acarreta seqüelas ou até a morte, muitas vezes, durante a primeira idade ou na juventude (TEIXEIRA e FIGUERÓ, 2001).

Cumprido o seu valor biológico de alerta, a dor quando se torna crônica pode constituir razão para incapacidade funcional, situação esta que justifica medidas destinadas à sua supressão. Entretanto muitas vezes, manifesta-se mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, tal como ocorre em casos de neuropatia periférica ou central e em certas afecções psicopatológicas (TEIXEIRA e FIGUERÓ, 2001).

A dor pode ser definida como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada ou descrita em termos de lesões teciduais. A dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo utiliza a palavra dor de acordo com o aprendizado frente a suas experiências prévias. É uma sensação desagradável localizada em uma parte do corpo” (definição segundo a International Association for the Study of Pain – IASP).

A dor manifesta-se através de dois componentes importantes: o componente nociceptivo que é sensorial e discriminativo; e o componente afetivo que é comportamental e associa-se às reações provocadas pela dor (ansiedade, medo, pânico, sofrimento).

1.2. Dor nociceptiva

Nocicepção deriva do Latim (*nocere* + *capêre*), onde *nocere* significa nocivo e *capêre* significa captar, receber. Ou seja, literalmente nocicepção significa captação do nocivo. Refere-se à recepção de sinais pelo SNC, evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados que transmitem informações (a transformação dos estímulos ambientais em potenciais de ação) que são transferidas para o sistema nervoso central por vias nervosas íntegras. Esses receptores são chamados de nociceptores e são representados por terminações nervosas livres presentes em fibras aferentes sensitivas, principalmente as fibras C e A-delta.

As fibras aferentes primárias cutâneas sensitivas podem ser classificadas essencialmente em cinco tipos com base no diâmetro, estrutura e velocidade de condução. As fibras C são finas, amielínicas e de condução lenta; as fibras A-delta são médias, pouco mielinizadas e de condução intermediária; e as fibras A-beta são calibrosas, mielinizadas e de condução rápida. Há ainda as fibras A alfa e as fibras A gama que são de grosso calibre e estão associadas a propagação de estímulos táteis. Cada classe de fibras aferentes codifica informações sensoriais, mas diferem na sensibilidade a estímulos nocivos ou não nocivos. Em condições normais apenas as fibras A-delta e C são capazes de transmitir informação nociceptiva (MILLAN, 1999).

Generalizando, durante a exposição a um estímulo nocivo as fibras mielinizadas A-delta iniciam uma fase rápida, primária da dor que é aguda por natureza, enquanto que, as fibras C invocam a segunda fase que é a de dor latejante e lenta. Os receptores de alto limiar localizados geralmente nas fibras C codificam informações pertencentes a estímulos nocivos mecânicos, químicos ou térmicos. É abundante o tipo de nociceptores que respondem a estímulos nocivos térmicos e mecânicos e o termo polimodal reserva-se à população de nociceptores que responde também a estímulos químicos irritantes além dos térmicos e mecânicos.

A atividade dos receptores nociceptivos é modulada pela ação de substâncias químicas denominadas de algio gênicas presentes no ambiente tecidual que são liberadas no local frente a algum estímulo. Essas substâncias algio gênicas são liberadas por diversas fontes como mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, células traumatizadas e são responsáveis pela hiperalgesia

observada em lesões traumáticas, inflamatórias e isquêmicas. Então além de estimular diretamente os nociceptores essas substâncias também podem torna-los sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos de baixa intensidade. Dentre as principais substâncias algio gênicas encontramos: acetilcolina, prostaglandinas, bradicinina, histamina, citocinas, serotonina, substância P, neurotrofinas, radicais ácidos, íons potássio dentre outras. O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P podem ser liberadas retrogradamente pelas terminações nervosas nociceptivas e podem, indiretamente, participar da liberação de vários mediadores químicos por células, na chamada inflamação neurogênica.

Há uma outra classe de nociceptor que recentemente vem atraindo interesse no contexto da dor prolongada: os chamados “silenciosos” ou “nociceptores dormentes”. Entretanto nenhuma classe de nociceptores apresenta atividade espontânea, o termo “silencioso” refere-se a uma porção (talvez 10-20%) de fibras C amielínicas na pele, articulações e vísceras que normalmente não são responsivas a estímulos nocivos agudos. Nas condições de inflamação e injúria tecidual, esse nociceptores silenciosos são sensibilizados e ativados por uma variedade de mediadores químicos (CERVERO *et al.*, 1994). O recrutamento desses nociceptores durante os estados patológicos deve contribuir para a somação temporal e espacial aumentando o envio de informação das fibras C para o corno dorsal da medula espinhal. Por exemplo, fibras aferentes primárias em articulações artríticas desenvolvem tanto atividade espontânea como emitem sinais em resposta a movimentos articulares antes inofensivos, e a inflamação de vísceras pode aumentar enormemente sua sensibilidade para estímulos mecânicos inócuos.

A ativação de nociceptores silenciosos pode explicar a natureza distinta dos estados inflamatórios dolorosos prolongados quando comparado à exposição aguda a estímulos nocivos passageiros. De fato, o recrutamento de nociceptores silenciosos promove uma importante contribuição para a sensibilização e as mudanças de adaptação central que suportam a hiperalgesia primária causada por inflamação tecidual (MILLAN, 1999).

O caminho entre a exposição inicial ao estímulo nocivo e a apreciação consciente da dor é uma extraordinária complexa e interativa série de mecanismos pelo qual o estímulo nocivo é codificado como mensagem

nociceptiva e é progressivamente transmitida aos e processada nas estruturas cerebrais superiores. Tal evento modulatório ocorre na periferia, no corno dorsal da medula espinhal (processamento primário), sítios supra espinhais como o tálamo (processamento secundário), assim como nas estruturas corticolímbicas.

1.3. Dor neuropática

Enquanto a dor nociceptiva é gerada por estímulos que acionam unidades nociceptivas periféricas e centrais onde é necessária a integridade das vias sensitivas, a dor por desaferentação ou dor neuropática refere-se a dor ocasionada por lesão neural periférica ou central. Pode ser causada por afecções traumáticas físicas ou químicas, doenças inflamatórias ou infecciosas degenerativas, oncopáticas, vasculares, tóxicas etc. O dano parcial ou mesmo a destruição de nervos periféricos deve estar associado a uma variedade de síndromes incluindo: o aumento da sensibilidade a estímulo nocivo (hiperalgesia), reposta dolorosa a estímulos mecânicos ou frios normalmente inócuos (alodinia), sensações parestésicas ou disestésicas e dor espontânea. Os mecanismos periféricos integrados no terminal nociceptivo dos aferentes primários sensitivos parecem ser os principais causadores da hiperalgesia primária fenômeno ligado a dor nociceptiva inflamatória, enquanto que a dor neuropática e a hiperalgesia secundária parecem estar largamente ligadas a mudanças ocorrendo ao longo da fibra aferente primária, como por exemplo o traumatismo da fibra (MILLAN, 1999).

Para que a informação sensitiva seja processada de modo adequado as propriedades funcionais dos axônios e das unidades centrais devem ser mantidas íntegras. Havendo modificações na função ou na anatomia das terminações nervosas (ex: modificação de canais iônicos), troncos nervosos periféricos ou das vias de condução e de processamento central da informação sensitiva, pode-se manifestar a dor espontânea ou a gerada por estímulos não nocivos.

Os mecanismos mais importantes envolvidos na gênese da dor por desaferentação são a atividade neuronal ectópica nos neurônios lesados e nos gânglios das raízes sensitivas; as correntes efáticas; a sensibilização das

unidades neuronais centrais; o desenvolvimento de sinapses aberrantes e as reações físicas, psíquicas e neuroendócrinas associadas à dor e à incapacidade (TEIXEIRA e FIGUEIRÓ, 2001).

1.4. Dor Visceral

A dor visceral é a forma mais comum de dor produzida por doença e uma das mais freqüentes razões pelas quais os pacientes procuram atendimento médico. A visão convencional trata a dor visceral como uma variante simples da dor somática, uma visão baseada na crença de que um único mecanismo neurológico é responsável por todos os tipos de dor. No entanto, apesar de os dois processos possuírem muitos fatores em comum também possuem importantes pontos diferentes. Este tema foi extensamente estudado por CERVERO et al. durante vários anos e em uma revisão atual o autor aponta as principais características e as novas descobertas feitas na área (CERVERO e LAIRD, 1999)

Os mecanismos neurológicos da dor visceral diferem daqueles observados na dor somática além da percepção e processamento psicológico serem distintos na dor visceral.

A dor visceral possui cinco importantes características clínicas: (1) não é evocada por todas as vísceras (órgãos sólidos como o fígado e rim não são sensitivos para a dor); (2) nem sempre está associada à injúria visceral (cortar o intestino não causa dor, por outro lado um estiramento da bexiga, o que não caracteriza injúria, causa dor); (3) é uma dor difusa e pouco localizada; (4) é referida para outras localizações e (5) é acompanhada de reflexos motores e autonômicos como náusea, vômito e tensão dos músculos lombares como ocorre nas cólicas renais.

O fato de a dor não poder ser evocada por todas as vísceras e que não está necessariamente associada à injúria levou a noção de que em algumas vísceras falta inervação aferente. Agora sabe-se que na verdade esse fenômeno é devido às propriedades funcionais dos receptores periféricos dos nervos presentes em certos órgãos viscerais e pelo fato de que várias vísceras são inervadas por receptores que não evocam percepção nociva e portanto não são receptores sensitivos no sentido estrito.

Estudos mais recentes indicam que há duas classes distintas de receptores sensoriais nociceptivos que inervam os órgãos internos. O primeiro tipo possui alto limiar para estímulos naturais (de maioria mecânicos) e são ativados por estímulos potencialmente nocivos. Estes receptores foram identificados no coração, veias, pulmões, vias aéreas, esôfago, intestino, cólon, bexiga e uretra. (CERVERO, 1996; GEBHART e SENGUPTA, 1994). A segunda classe de nociceptores codifica a intensidade do estímulo, possuem baixo limiar para estímulos naturais (na maioria mecânicos) e detém uma função codificadora que abrange a classificação da intensidade de estímulo de inócuo a nocivo. Estes receptores constituem uma categoria homogênea que codificam a intensidade do estímulo de acordo com a magnitude de sua descarga. Já foram localizados no coração, esôfago, cólon, bexiga e testículo (CERVERO, 1996; GEBHART e SENGUPTA, 1994). As evidências mostram que receptores de alto limiar e os receptores codificadores de intensidade contribuem para a captação dos eventos nocivos nas vísceras.

No que diz respeito aos eventos bioquímicos que ocorrem na dor visceral há duas classes bioquímicas de fibras aferentes primárias amielínicas de fino calibre que inervam ao tecidos somáticos e viscerais: a primeira classe contem neurônios que expressam peptídeos neurotransmissores como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e segunda classe de fibras não expressam esses peptídeos (SNIDER e McMAHON, 1998). As fibras somáticas incluem as duas classes bioquímicas de neurônios mas o papel funcional das duas classes ainda não está bem esclarecido. Em contraste a maioria das fibras aferentes amielínicas viscerais parecem pertencer ao do tipo que expressa os peptídeos neurotransmissores (PERRY e LAWSON, 1998; SEMENENKO e CERVERO, 1992). Esta descoberta tem importante implicação para o desenvolvimento futuro de terapias para a dor visceral, pois sugere que peptídeos são particularmente importantes na transmissão da informação à partir da víscera.

2. DOR INFLAMATÓRIA

2.1. Aspectos gerais

A dor nos estados inflamatórios está geralmente associada à presença de mediadores químicos que são liberados por células não neuronais no local da injúria. Dependendo da natureza do mediador este poderá apenas sensibilizar, isto é, diminuir o limiar de ativação do nociceptor, ativar o receptor ou então ambas as coisas. A sensibilização do nociceptor vem sendo denominada clinicamente como hiperalgesia, caracterizada pelo abaixamento do limiar a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos na área inflamada. Os receptores descritos geralmente associados à essa sensação de dor são os polimoidais de alto limiar pertencentes a fibras C amielínicas.

2.2. Mediadores da dor inflamatória

Durante o processo inflamatório várias etapas parecem estar associadas à ação de substâncias endógenas que modificam fisiológica e bioquimicamente a estrutura do local afetado. Essas substâncias químicas, geralmente chamadas de mediadores, são inicialmente liberadas no local da injúria por uma reação de alarme, onde macrófagos parecem ter um papel crucial (FERREIRA, 1980). Estas células sinalizam a presença de material estranho ou a injúria através da liberação de mediadores clássicos da inflamação e/ou de citocinas. Esses mediadores e citocinas recrutam células migrantes como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos e/ou linfócitos que possuem um papel amplificador no desenvolvimento da resposta inflamatória. A ação de mediadores e citocinas em receptores específicos sinalizam a resposta tecidual, os mecanismos de defesa, e produzem os sintomas da inflamação do qual a dor tem seu papel particular (FERREIRA, 1993).

Os mediadores associados á dor no processo inflamatório podem ser classificados em dois tipos: (1) aqueles que causam a sensibilização do nociceptor (hiperalgésicos) e (2) aqueles que causam a sua ativação direta, provocando a dor declarada em humanos, ou o comportamento característico em animais experimentais.

Mediadores hiperalgésicos

A sensibilização dos receptores da dor vem sendo denominador comum da dor inflamatória. Essa sensibilização dos nociceptores leva a um estado conhecido como hiperalgesia\alodinia. Após a sensibilização, estímulos que antes eram pouco efetivos ou totalmente inefetivos agora causam dor declarada em humanos ou comportamento característico em animais de experimentação. A hiperalgesia pode ser classificada como imediata, tardia ou persistente dependendo da duração do platô. Prostaciclina (PGI_2) produz hiperalgesia imediata, atingindo o pico em 30 min e declinando com 1h de sua injeção, sem obter platô. Hiperalgesia tardia pode ser induzida por PGE_2 e aminas simpatomiméticas (FERREIRA *et al.*, 1978; NAKAMURA e FERREIRA, 1987) a qual tem evolução lenta, atinge o pico após 2 a 3 horas seguido de um platô de 2 horas e declina em seguida. Hiperalgesia persistente é gerada por períodos freqüentes de sensibilização de nociceptor e tem duração de semanas. A injeção sucessiva diária de PGE_2 ou dopamina induz hiperalgesia persistente (FERREIRA *et al.*, 1990).

Os mecanismos associados à hiperalgesia inflamatória vem sendo estudados e há evidências de que mediadores capazes de aumentar a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e do íon cálcio (Ca^{++}) estão associados com a sensibilização dos nociceptores. Foi demonstrado que, a administração de dibutiryl AMPC (um análogo de AMPC capaz de atravessar a membrana plasmática) ou Ca^{++} causa hiperalgesia quando injetada em pata de rato (FERREIRA & NAKAMURA, 1979a). A mesma evidência foi suportada por outros autores em outros modelos (FOLLENFANT *et al.*, 1990; TAIWO *et al.*, 1989). Prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (dopamina ou noradrenalina) são mediadores conhecidos por estimular a síntese de AMPC neuronal e já foram comprovados como substâncias que causam sensibilização de nociceptores (WIESENFELD-HALLIN e HALLIN, 1984). Em 1972 FERREIRA demonstrou, no modelo de hiperalgesia plantar em ratos, que a injeção local de prostaglandina causa hiperalgesia e que drogas inibidoras da ciclooxygenase inibem esse efeito hiperalgésico. Da mesma maneira, foi demonstrado que a injeção de agonistas adrenérgicos (dopamina, adrenalina, isoprenalina) causava hiperalgesia em pata de rato e que o pré-

tratamento com bloqueadores adrenérgicos foi capaz de inibir essa hiperalgisia como também aquela induzida por carragenina. Isso comprovou que além de um componente eicosanóide, há um componente simpático participando da sensibilização do nociceptor durante o processo inflamatório, provavelmente mediado pelo receptor D₁ da dopamina. No entanto o tipo de receptor envolvido pode variar de acordo com o modelo experimental e com o tipo de animal utilizado (NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

A importância dos dois tipos de mediadores na dor inflamatória foi suportada por outros autores em outros modelos experimentais como o de contorções abdominais induzidas por ácido acético e zymosan (DUARTE *et al.*, 1988; THOMAZZI, 1996). Em adição, mediadores capazes de estimular a síntese de prostaglandinas ou de aminas simpatomiméticas são também ditos hiperalgésicos como é o caso de citocinas como IL-1, TNF e IL-8. E ainda, mediadores que estimulam a síntese dessas citocinas hiperalgésicas como é o caso da bradicinina, também podem entrar nessa mesma classificação.

No entanto, há um outro sistema que parece participar da regulação dos receptores da dor durante a inflamação, dessa vez, aumentando o limiar de excitabilidade dos nociceptores. O bloqueio direto da hiperalgisia, já instalada, induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) foi observado após a administração local de pequenas doses de dibutilil guanosina monofosfato cíclico (Db-GMPc) (FERREIRA & NAKAMURA., 1979b) ou de substâncias que estimulam a guanilato ciclase neuronal como por exemplo carbacol e geradores de óxido nítrico (DUARTE *et al.*, 1992). Parece que a regulação funcional de nociceptores depende do equilíbrio entre as concentrações de AMPc e GMPc.

Mediadores que ativam diretamente o nociceptor

Dentre os mediadores capazes de ativar diretamente o nociceptor, a bradicinina merece um papel de destaque. A injeção subcutânea de bradicinina, em humanos, vem sendo há muito tempo associada à manifestação de dor (ARMSTRONG *et al.*, 1953; SICUTERI *et al.*, 1965; FERREIRA, 1972). Mas também já foi demonstrado que bradicinina em alguns modelos experimentais, causa um posterior efeito hiperalgésico demorado. Sugeriu-se que esse efeito hiperalgésico era mediado pela liberação de prostanóides, pois foi inibido pela administração de indometacina (inibidor da

cicloxygenase), contudo, tal efeito não estava associado à dor declarada (TAIWO & LEVINE, 1988; STERANKA *et al.*, 1987; 1988).

Como já foi visto, a bradicinina parece ter um duplo papel na modulação da dor, pois foi descrita como substância capaz de ativar diretamente o nociceptor e como um mediador hiperalgésico. Isso pode ser explicado pela sua ligação a diferentes tipos de receptores. Já foram descritos até 4 tipos de receptores para a bradicinina (Bk₁ - Bk₄) mas dois deles, Bk₁ e Bk₂, merecem destaque na modulação da dor inflamatória. O receptor Bk₂ foi associado com a ativação direta de fibras aferentes finas que foram descritas como condutoras de estímulos da nocicepção (STERANKA e BURCH, 1991; FARMER e BURCH, 1992). Entretanto, em um estudo mais recente, esse receptor foi associado também à sensibilização do nociceptor, mediada pela liberação de uma cascata de citocinas que irão estimular a liberação de produtos da cicloxygenase e de aminas simpatomiméticas (FERREIRA *et al.*, 1993), tema que será abordado posteriormente. Então o receptor Bk₂ já foi associado com nocicepção e com hiperalgesia. Através do receptor Bk₁ foi demonstrada a participação da bradicinina na ativação direta do nociceptor. O antagonista para esse receptor da bradicinina foi capaz de inibir a fase imediata do teste da formalina em camundongos (SHIBATA *et al.*, 1989; CORREA E CALIXTO, 1993). Em estudos posteriores (1997), TONUSSI e FERREIRA, usando antagonistas específicos para cada tipo de receptor, demonstraram, no modelo de incapacitação articular em ratos, que bradicinina induzia a sensibilização do nociceptor através dos receptores Bk₂ e que a ativação do nociceptor se devia à sua ação em receptores Bk₁.

Histamina, um mediador inflamatório conhecido, parece também estar associado à resposta dolorosa. Encontra-se principalmente estocada em grânulos no interior de mastócitos e é um dos principais mediadores da resposta alérgica. É liberada também durante a resposta inflamatória e parece participar da dor inflamatória por ativar diretamente o nociceptor. Entretanto, sua liberação está associada principalmente com a sensação de prurido (FERREIRA., 1980). Além da histamina e da bradicinina outros mediadores parecem também participar da ativação das terminações nociceptivas durante a inflamação dentre eles: serotonina, substância P, adenosina trifosfato (ATP) e prótons H⁺(RANG *et al.*, 1991).

Em muitos casos a ativação do receptor por esses mediadores, para manifestação de dor, só é possível mediante a sensibilização prévia por mediadores hiperalgésicos. Dentre esses mediadores hiperalgésicos as citocinas merecem destaque.

3. PAPEL DE CÉLULAS RESIDENTES NA GERAÇÃO DA DOR AGUDA

3.1. Macrófagos

Macrófagos tradicionalmente são associados com inflamação crônica. Na verdade, são residentes nos tecidos e constituem as células de alarme do organismo (FERREIRA,1980). São hábeis em reconhecer o “não próprio” e com isso promover a sinalização do processo inflamatório. Eles fazem isso por meio de liberação de mediadores como prostaglandinas ou através da liberação de citocinas, substâncias que agem tanto no local como sistemicamente. São células altamente secretoras. Seus produtos, ao todo, mais de 100 descritos, incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, proteínas regulatórias tipo IL-1, IL-8, IL-6, fator transformador de crescimento- β (TGF- β), além dos derivados do ácido araquidônico (TAKAEMURA & WERB, 1984; NATHAN, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1989). A maioria dessas moléculas são importantes na reação inflamatória, sendo que, a secreção de muitas delas depende do estado metabólico do macrófago o que por sua vez depende da interação do mesmo com seu microambiente (NATHAN , 1987).

Já foi descrito que macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo derivado de *E. Coli* (LPS) liberam, em cultura, um fator com um PM maior que 10 kDa que quando injetado intraperitonealmente, em camundongos, é capaz de induzir contorções abdominais. Essa substância, liberada por monocamadas de macrófagos, foi denominada fator nociceptivo derivado de macrófago (MNF) (DE CAMPOS *et al.*, 1988). Posteriormente a esses achados, foi demonstrado que o MNF não é um produto da cicloxigenase, visto que inibidores dessa enzima, como indometacina ou paracetamol, não afetam a sua liberação. Foi sugerido então, que o MNF é um composto protéico, e que sua atividade é devido à presença de citocinas como IL-1, IL-8 e TNF- α (THOMAZZI *et al.*,

1997), já descritas como componentes do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS usado na preparação desse fator (RIBEIRO *et al.*, 1991; 1995). Em adição, a indução de contorções abdominal por MNF foi inibida pelo pré-tratamento dos animais com indometacina, paracetamol, guanetidina e atenolol, indicando que a sua atividade nociceptiva resulta da indução da liberação de produtos da cicloxigenase e de simpatomiméticos pelas citocinas supracitadas (THOMAZZI *et al.*, 1997).

A importância da presença de células residentes, como macrófagos, no local da injúria para a sinalização dos eventos da resposta inflamatória já foi descrita. Alguns achados nesse sentido demonstram que a intensidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal de animais estimulados com carragenina, zymosan e LPS (estímulos exógenos) ou com IL-1 e TNF- α (estímulos endógenos) é proporcional ao número de macrófagos residentes presente nessa cavidade (FACCIOLLI *et al.*, 1990; CUNHA & FERREIRA, 1986; DE SOUZA & FERREIRA, 1985; SOUZA *et al.*, 1988). Na dor inflamatória a presença dessas células parece ser crucial da mesma forma. O nosso laboratório tem demonstrado, nos últimos anos, a importância de macrófagos residentes na nocicepção induzida por estímulos como ácido acético e zymosan no modelo de contorções abdominais. Alguns resultados demonstram que a depleção de células residentes da cavidade peritoneal, por lavagem prévia, diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e do zymosan (ver ilustração 1) mas não a do iloprost (análogo estável da PGI₂). Quando aumentamos a população de macrófagos, através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato (ver ilustração 1.1 e 1.2), aumentam-se também o número de contorções induzidas por esses estímulos (THOMAZZI, 1996, RIBEIRO *et al.*, 2000).

3.2. Mastócitos

Os mastócitos são células capazes de secretar e produzir mediadores que podem modificar eventos vasculares e celulares. Exercem um importante papel não só em reações alérgicas, mas também em inúmeros processos inflamatórios. Frente a um estímulo inflamatório, mastócitos liberam mediadores (i) alguns pré-formados, estocados em grânulos, como: histamina,

serotonina, proteases, heparina e TNF liberados imediatamente na presença do estímulo; (ii) outros sintetizados a partir do metabolismo de lipídeos da membrana (prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária) que são liberados em poucos minutos; (iii) e também são capazes de produzir citocinas dentre elas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e TNF (ilustração 1.3). Além disso, são capazes de liberar óxido nítrico (MANNIONI *et al.*, 1991; BISSONNETTE *et al.*, 1991; SALVEMINI *et al.*, 1990; MASINI *et al.*, 1991).

A produção de citocinas por mastócitos não é uma mera resposta aguda à ativação celular mediada por IgE, ela persiste por várias horas após a ativação por uma variedade de estímulos incluindo produtos bacterianos e prostanoídes. (MARSHALL *et al.*, 1996). Outros autores demonstraram que TNF liberado por mastócitos estimulados por IgE é derivado de duas diferentes fontes: o pré-formado, que faz parte dos mediadores que são liberados nos primeiros 10 min após a estimulação, e o recém sintetizado, que é continuamente liberado após estimulação. Indicando que TNF representa um tipo de mediador associado ao mastócito, célula que expressa bioatividade através dos efeitos de produtos pré-formados e recém sintetizado (GORDON AND GALLI, 1991).

A importância dos mastócitos na modulação da dor já é assunto discutido na literatura. Mastócitos são uma parte constitutiva do eixo “neuroimune” e já foi mostrado, através de microscopia eletrônica, que essas células estão intimamente associadas à fibras nervosas sensitivas contendo neuropeptídeos como substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (STEAD *et al.*, 1989) conhecidos por estarem envolvido na fisiopatologia da dor (MAYER *et al.*, 1994) e também por induzir a secreção de mediadores por mastócitos humanos (LOWMAN *et al.*, 1998). Além disso, os mediadores liberados por mastócitos como histamina, bradicinina, serotonina e citocinas são considerados moléculas pró-nociceptivas que ativam direta ou indiretamente aferentes primários sensitivos induzindo hiperalgesia (LEVINE *et al.*, 1992).

Nesse sentido, dados nossos já publicados demonstram que mastócitos residentes da cavidade peritoneal parecem importantes no desenvolvimento da resposta dolorosa do ácido acético e zymosan. A depleção de mastócitos peritoneais de camundongos pelo pré-tratamento com o composto 48/80

diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e do zymosan no modelo de contorções abdominais (ver ilustração 1.4; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Mastócitos também devem contribuir para a migração de neutrófilos, pois camundongos WBB6F1-W/W^v (W/W^v) deficientes de mastócitos mostraram uma significativa redução da migração de neutrófilos, que se segue à injeção de zymosan, quando comparados com controles apropriados (cepa WBB6F1-+/+) (RAO *et al.*, 1994). Além disso, a migração de neutrófilos induzida por IL-8 ou leucotrieno B₄ (LTB₄) depende do número da população de mastócitos residentes presentes no sítio do estímulo (RIBEIRO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997).

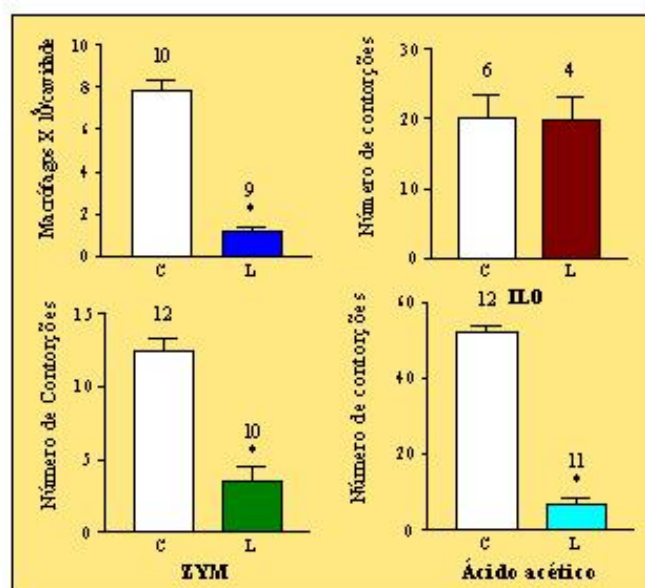


Ilustração 1.1. A redução da população de células residentes diminui significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético mas não a do Iloprost (ILO). Figura retirada de Ribeiro *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 387 (2000), com permissão.

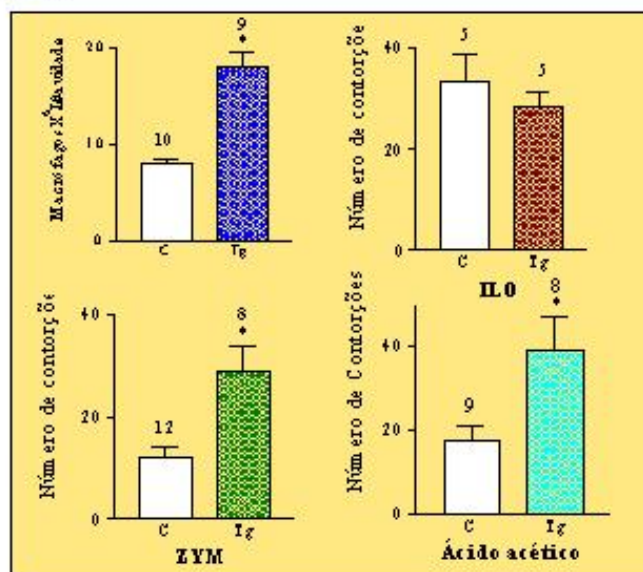


Ilustração 1.2. O pré-tratamento com tioglicolato aumenta significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético mas não a do Iloprost (ILO). Figura retirada de Ribeiro *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 387 (2000) com permissão.

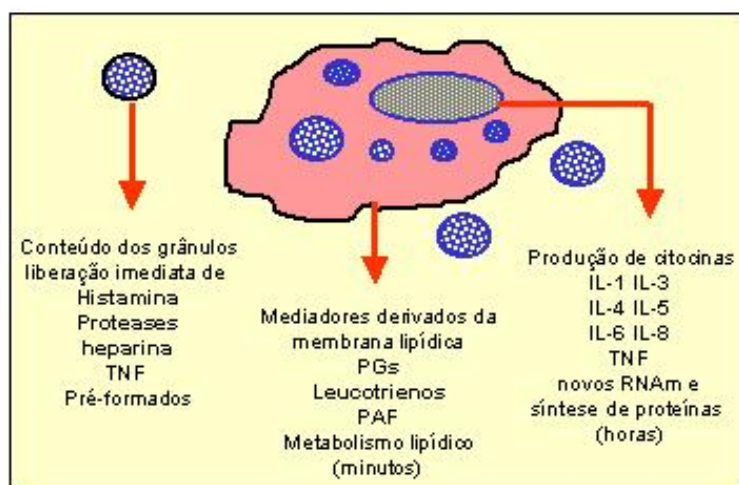


Ilustração 1.3. Mediadores Inflamatórios liberados por mastócitos ativados

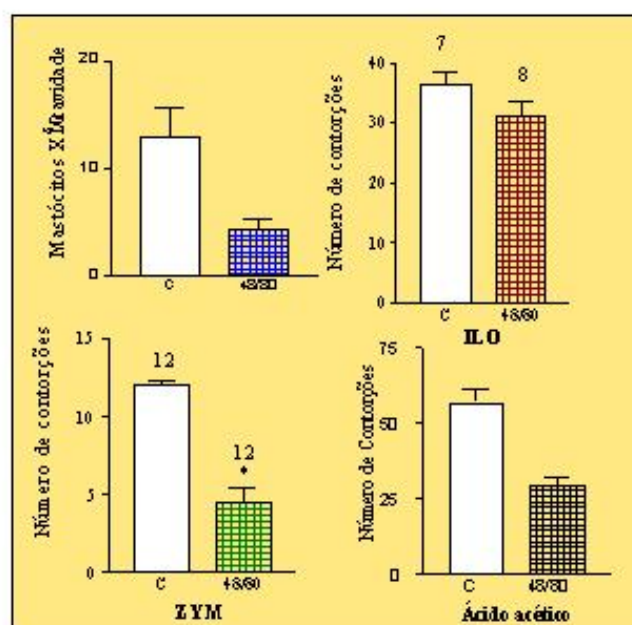


Ilustração 1.4. O pré-tratamento crônico com o composto 48/80 diminui significativamente a atividade nociceptiva do zymosan (ZYM) e do ácido acético mas não a do Iloprost (ILO). Figura retirada de Ribeiro et al., *Eur. J. Pharmacol.* 387 (2000), com permissão.

4. MODULAÇÃO DA DOR POR CITOCINAS

Citocinas são polipeptídios simples, ou glicopeptídeos, de peso molecular menor ou igual a 80 kDa, com propriedades pleiotrópicas e regulatórias. São produzidas e secretadas por diversos tipos celulares em resposta a uma infinidade de estímulos, para agir em receptores específicos presentes em células alvo. Como são substâncias com diversas funções regulatórias, tais moléculas não são produzidas de maneira contínua. A sua produção é induzida ou suprimida por estímulos aos quais o organismo precisa responder. Os vários tipos de citocinas incluem as interleucinas (IL), os fatores de necrose tumoral (TNF), os interferons (IFN), os fatores estimulantes de colônia da medula óssea e uma variedade de outros fatores de crescimento (fatores de crescimento derivados de fibroblastos, da epiderme e das plaquetas) (HOPKINS, 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que citocinas podem influenciar a direção de uma resposta imune por mecanismos parácrinos, endócrinos e autócrinos. A capacidade que possuem de exercer efeito local, regional e sistêmico é um ponto importante da biologia dessas substâncias, pois demonstra o papel fisiopatológico desses mediadores na doença. A elevação da temperatura, indução de sono e supressão do apetite são todas manifestações sistêmicas de doença, porém, isso pode representar apenas alterações dos níveis de citocinas que normalmente controlam a nossa fisiologia circadiana. Um aumento dos níveis de citocinas que estão associadas com a inflamação pode concomitantemente ativar células inflamatórias e alterar a fisiologia normal. Ambos os eventos podem ser importantes no combate à doença através dos mecanismos de defesa. Em adição, os efeitos sistêmicos associados com inflamação severa podem ser exercidos pela produção exagerada de citocinas e pela manutenção dessa produção pelas próprias citocinas (KUNKEL *et al.*, 1991).

Uma citocina tende a ter múltiplas células alvo e múltiplas funções, no entanto, citocinas diferentes podem ter ações similares. A exposição de células a duas ou mais citocinas diferentes pode levar a respostas qualitativamente diferentes. Além disso, uma citocina pode aumentar (ou diminuir) a produção de outra citocina (ou dela mesma) ou a expressão de receptores para outra

citocina e assim resultar em ações indiretas. Um exemplo disso seria a demonstração da ação mitogênica da IL-1 em timócitos murinos, uma das primeiras descobertas nesse sentido. Essa ação mitogênica envolve a estimulação da produção de IL-2 por IL-1, sendo IL-2 a verdadeira molécula efetora responsável pela estimulação da proliferação de timócitos (SMITH *et al.*, 1980). Esse efeito estimulatório de IL-1 na produção de IL-2 e o papel dessa interação na proliferação de células T tornaram-se um paradigma para as ações de muitas outras citocinas. Após isto, descobriu-se que IL-1 também é capaz de estimular a produção de IL-6 (CONTENT *et al.*, 1985), GM-CSF (ZUCALI *et al.*, 1986), IL-8 (MATSUSHIMA *et al.*, 1989), e o fator ativador e quimiotático para monócito, MCAF (LARSEN *et al.*, 1989) em vários tipos celulares. Todas essas citocinas são também induzidas por TNF o que está em consonância com as inúmeras similaridades vistas entre as ações de IL-1 e TNF (LE e VILCEK, 1987, NETA *et al.*, 1992). Em monócitos tanto TNF como IL-1 agem como agentes estimulatórios com resposta individual, e em adição, eles estimulam a produção um do outro, o que amplifica a resposta individual de ambos (NETA *et al.*, 1992).

4.1. Citocinas e indução de resposta nociceptiva

A participação de citocinas na dor inflamatória é um assunto que atualmente vem sendo muito estudado. Diversos autores utilizando modelos distintos ou mesmo estudos clínicos vem sendo realizados no intuito de demonstrar a participação desses mediadores na fisiopatologia da dor. Observou-se a sua importância na hiperalgesia inflamatória. Como já foi dito, a hiperalgesia parece ser causada pela ação de mediadores liberados por duas vias distintas: a hiperalgesia causada por eicosanóides e a hiperalgesia causada por simpaticomiméticos. Após essas confirmações, foi demonstrado que a liberação de produtos da ciclooxigenase e de aminas simpatomiméticas é subsequente à liberação IL-1 β (FERREIRA *et al.*, 1988) e de IL-8 (CUNHA *et al.*, 1991) respectivamente, o que foi evidenciado no modelo de hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-Selitto modificado por FERREIRA *et al.*, 1978). Nesses estudos, a hiperalgesia induzida por IL-1 β foi bloqueada por indometacina (inibidor da ciclooxigenase), mas não por drogas simpatomiméticas.

(propranolol, atenolol ou guanetidina), enquanto que a hiperalgisia induzida por IL-8 foi bloqueada pelo pré-tratamento com simpatolíticos, mas não por indometacina. Ademais, a hiperalgisia induzida por carragenina foi parcialmente bloqueada por ambos os tipos de drogas (CUNHA *et al.*, 1991).

Sabendo da capacidade de várias citocinas em induzir a sua própria produção e a produção de outras citocinas como: TNF que induz a produção de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986), IL-1 que induz a produção de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1987), IL-6 (VAN DAMME *et al.*, 1987), e IL-8 (STREITER *et al.*, 1989), esses mesmos autores CUNHA *et al.*, em 1992a, demonstraram um papel de pivô para o TNF na modulação da hiperalgisia induzida por carragenina no mesmo modelo experimental. Foi proposto que TNF ativa uma cascata de liberação de citocinas. A indução da liberação de IL-8 ou CINC-1 (quimioatraente par neutrófilo) por TNF leva à hiperalgisia mediada por simpaticomiméticos, e a indução de IL-1 β e IL-6 por TNF leva à hiperalgisia mediada por produtos da ciclooxigenase. Isso foi confirmado pelo fato de que a injeção de TNF mimetizou a capacidade da carragenina em induzir a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8/CINC-1 e também pelo fato de que uma única injeção com o anticorpo anti-TNF foi capaz de abolir esse efeito da carragenina (CUNHA *et al.*, 1992a; LORENZETTI *et al.*, 2002). As mesmas evidências foram demonstradas no modelo de contorções abdominais (DUARTE *et al.*, 1988; THOMAZZI, 1996). A cascata de citocinas iniciada por TNF já havia sido demonstrada em um modelo de sepse experimental onde foi sugerido que TNF exerce importante papel na propagação da cascata de mediadores que participam da defesa do hospedeiro. Em 1990, FONG AND LOWRY, revisaram tal assunto e concluíram que TNF: (i) é um dos primeiros mediadores secretados em resposta a um estímulo nocivo; (ii) a sua administração a animais e humanos induz a liberação de outros mediadores endógenos; (iii) a neutralização da sua atividade diminui a liberação de outros mediadores durante uma bacteriemia. Dentre os mediadores que são liberados em resposta ao TNF estão as citocinas IL-1 e IL-6. Esta liberação ocorre em forma de cascata. TNF é liberado após 15-30 min da injeção de um agente infeccioso, sendo o pico de TNF circulante aos 90 min. IL-1 não atinge o pico antes das 4 horas após a injeção do agente estimulante enquanto que os níveis de IL-6 ainda estão subindo ao final de 8 h de observação. A administração profilática

do anticorpo monoclonal anti-TNF foi capaz de inibir a liberação de IL-1 e IL-6 no modelo de sepse observado em tal estudo confirmando os dados anteriores.

Hoje sabe-se que a cascata de citocinas promovida por TNF na hiperalgesia inflamatória, em alguns casos, era subsequente à ação da bradicinina, dependendo da intensidade e do tipo de estímulo. Isto foi demonstrado por FERREIRA *et al.* (1993) em experimentos onde o pré-tratamento de animais com HOE-140, um antagonista seletivo para o receptor Bk₂ da bradicinina, foi efetivo em bloquear hiperalgesia induzida por carragenina, mas não foi capaz de bloquear a hiperalgesia induzida por TNF. Além disso, ao se pré-tratar os animais com um anti-soro específico para TNF (anti-TNF) a hiperalgesia induzida por bradicinina ficou bastante reduzida, sugerindo que bradicinina estaria induzindo a liberação de TNF. Em adição, a hiperalgesia induzida por altas doses de LPS não foi inibida por HOE-140, propondo que se o estímulo hiperalgésico é de magnitude suficiente, a cascata de citocinas pode ser acionada independentemente da estimulação do receptor Bk₂ (FERREIRA *et al.*, 1993).

Bradicinina pode não só iniciar a cascata de mediadores, mas também contribuir para a manutenção dessa cascata e da injúria através dos receptores Bk₁, receptores que são ativados por IL-1 β mas não por TNF, demonstrado em modelos de hiperalgesia térmica e mecânica (PERKINS & KELLY, 1993; DAVIS & PERKINS, 1994). Foi proposto, então, que receptores Bk₂ participariam da fase inicial da resposta dolorosa inflamatória e Bk₁ manteria o estado doloroso (DRAY & PERKINS, 1993). No modelo de contorções abdominais também foi demonstrado o papel inicial da bradicinina, a qual mesmo em doses altas não foi capaz de induzir resposta nociceptiva, porém, a administração prévia de HOE-140 diminui as contorções induzidas pela associação de TNF, IL-1 e IL-8 (THOMAZZI, 1996).

O contrário também é válido, TNF induz a liberação de Bradicinina. Em 1999 foi demonstrado por TONUSSI e FERREIRA que TNF pode induzir incapacitação articular quando dado em articulações previamente estimuladas (72 h antes) com carragenina. Esta incapacitação é mais intensa, atinge o pico em 1 hora e pode durar até 5 horas. A incapacitação é inibida pelo pré-tratamento com o antagonista de receptor B₁ da bradicinina. Os autores sugerem que a persistência da incapacitação deve-se a um feedback positivo

entre os dois mediadores (bradicinina gerando TNF e TNF gerando bradicinina). Neste mesmo estudo foi observado ainda que a incapacitação induzida por carragenina é mediada por TNF, pois o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF inibiu a nocicepção. Além disso TNF também induz a liberação de leucotrieno, visto que o inibidor da lipoxigenase MK 886 inibiu a incapacitação persistente induzida por TNF (TONUSSI e FERREIRA, 1999).

O papel de TNF além de IL-1 β e IL-8 na dor crônica experimental foi observada no modelo de hiperalgesia persistente (SACHS *et al.*, 2002). Demonstrou-se que a injeção diária de TNF, IL-1 β ou IL-8 por mais de 18 dias induzia uma hiperalgesia persistente que durava 30 dias após o término da indução. A hiperalgesia persistente induzida por IL-8 era abolida pelo pré-tratamento diário com atenolol, a induzida por IL-1 β era abolida pelo tratamento diário com indometacina e a hiperalgesia persistente induzida por TNF era totalmente abolida pelo tratamento diário com a associação indometacina e atenolol. Estudos prévios relatam que a hiperalgesia persistente é causada por estímulo persistente e os autores sugerem que estímulos persistentes induzem uma produção contínua de TNF o que levaria a liberação de IL-1 β e IL-8 assim induzindo a liberação de mediadores finais como eicosanóides e simpatomiméticos que então sensibilizariam o nociceptor.

Em um estudo recente de dor crônica foi desenvolvido um modelo experimental em que a injeção de carragenina, numa dose que produz inflamação de curta duração, causa uma facilitação crônica da hiperalgesia induzida pela administração subsequente de mediadores inflamatórios. Durante este estado latente ou facilitado, o qual dura pelo menos 30 dias, o limiar nociceptivo mecânico retorna a seu nível basal (pré-carragenina), no entanto quando é feita a administração de PGE₂ há o aparecimento de uma hiperalgesia prolongada que dura até 24 horas. Tal modelo caracteriza o estado de facilitação da hiperalgesia crônica (ALEY *et al.*, 2000). Em 2003 PARADA *et al.* demonstraram que TNF media a facilitação da hiperalgesia crônica (ou hiperalgesia crônica latente) induzida por carragenina pois o tratamento com talidomida ou anticorpo anti-TNF antes da carragenina tanto inibiu a hiperalgesia aguda (medida 4 horas após estímulo) como a facilitação crônica que foi medida depois de 5 dias da injeção de carragenina e evocada

com PGE₂. Os mesmos autores ainda observaram que TNF também por si só induz tanto a hiperalgesia aguda assim como a facilitação da hiperalgesia crônica e que essa hiperalgesia latente não é inibida por indometacina ou por um inibidor simpático indicando que o papel de TNF na facilitação da hiperalgesia crônica é diferente do da hiperalgesia aguda. Outros dados do mesmo estudo sugerem que TNF induz a hiperalgesia crônica latente através de seu receptor TNFR1 ativando a proteína quinase C ϵ enquanto que sua ação na hiperalgesia aguda seria de uma maneira indireta talvez induzindo a liberação de outros mediadores.

Outro estudo relata que a atividade nociceptiva de TNF está relacionada principalmente a fibras do tipo C onde a citocina produziria uma sensibilização aguda de mecanismo rápido talvez por ação em receptores presentes nas fibras C ou então ativando a enzima COX levando a geração de eicosanóides (JUNGER AND SORKIN, 2000). Outros dados revelam que a administração intraperitoneal de LPS e IL-1 β produz hiperalgesia via estimulação subdiafragmática de aferentes vagais que carregam a informação de injúria diretamente ao tronco encefálico, ao invés de passar pela medula espinhal. TNF também induz hiperalgesia dose-dependente quando dado i.p., mensurada pelo teste de retirada da cauda. Tal hiperalgesia é bloqueada tanto pelo antagonista do receptor de IL-1 como pela vagotomia subdiafragmática sugerindo que TNF causa hiperalgesia por induzir a liberação endógena de IL-1 e também que o efeito é suportado por uma rota neural ao invés de humoral (WATKINS *et al.*, 1995a e b). De fato a vagotomia subdiafragmática bloqueia o aumento da imunorreatividade Fos-like e de RNAm no cérebro induzido por LPS e IL-1 periféricos. Esses efeitos parecem ser produzidos por uma ligação das citocinas à paragânglia que forma sinapses com fibras vagais onde já foi demonstrado existirem sítios de ligação tanto para TNF como para IL-1 (WATKINS *et al.*, 1995b).

4.2. Citocinas e inibição da resposta nociceptiva

Vem tornando-se cada vez mais importante a inibição de citocinas que participam da resposta inflamatória e da dor inflamatória por estas serem de fundamental importância para o desenvolvimento de ambas. Muitos estudos

utilizam inibidores como os antagonistas do receptor para IL-1 (IL-1ra) ou proteínas ligantes para TNF ou IL-1, como os seus receptores solúveis para esse fim. Outros trabalhos utilizando citocinas que inibem a síntese de TNF e IL-1, dentre outras citocinas pró-inflamatórias, como também citocinas que promovem a produção de seus inibidores naturais, mostraram que a resposta inflamatória tem moduladores negativos endógenos, servindo como um freio para a inflamação. Essas citocinas tem a vantagem de inibir tanto a síntese de IL-1 e TNF como a de outras citocinas e mediadores. Na lista de citocinas que possuem essas propriedades inibitórias estão: IL-4, IL-10, IL-13, IL-6, TGF- β e IFN- α .

IL-10 é produzida por diversos tipos celulares incluindo linfócitos Th2, monócitos, macrófagos e mastócitos (FIORENTINO *et al.*, 1989). Acredita-se que IL-10 tem um papel inibitório importante nas reações de hipersensibilidade tardia (HOWARD AND O'GARRA, 1992) e na supressão das funções de macrófagos como a expressão de MHC classe II (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991b, adesão (FIORENTINO *et al.*, 1991), síntese de citocinas pró-inflamatórias e expressão de COX-2 e NOSi (BOGDAN *et al.*, 1991; DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991a; FIORENTINO *et al.*, 1991; OSWALD *et al.*, 1992; CUNHA *et al.* 1992b, NIIRO *et al.*, 1995, 1997). Também já foi demonstrado que IL-10 inibe a hiperalgisia inflamatória mecânica induzida por carragenina através de dois mecanismos: inibição de citocinas hiperalgésicas e bloqueio da indução de COX-2 (POOLE *et al.*, 1995)

IL-4 e IL-10 são produzidas principalmente por linfócitos Th2 e por mastócitos (McKENZIE *et al.*, 1993; BURD *et al.*, 1995; DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1995) e possuem inúmeras atividades biológicas parecidas que incluem a inibição de citocinas pró-inflamatórias (HART *et al.*, 1989; CALLARD *et al.*, 1996; MUCHAMUEL *et al.*, 1997) e a indução de COX-2 e de NOSi com a conseqüente redução da produção de prostaglandinas e óxido nítrico (SEITZ *et al.*, 1994; NIIRO *et al.*, 1995; ONOE *et al.*, 1996). IL-4 também inibe a hiperalgisia tardia em animais experimentais e em humanos (ROCKEN *et al.*, 1996), possivelmente pela sua capacidade de induzir resposta de linfócitos Th2. IL-13 parece exercer papel inibitório importante na artrite reumatóide desde que está presente em alta quantidade no fluído sinovial e inibe a produção de IL-1 e TNF por células mononucleares (ISOMAKI *et al.*, 1996).

Recentemente foi demonstrado que IL-4 provavelmente liberada por mastócitos e IL-13 (provavelmente liberada por linfócitos T locais) inibem a hiperalgesia inflamatória mecânica induzida por carragenina e bradicinina (CUNHA *et al.*, 1999; LORENZETTI *et al.*, 2001). Esse efeito anti-hiperalgésico parece ser devido à inibição de prostaglandina E₂ e produção de citocinas.

Utilizando modelos experimentais recentemente demonstramos o efeito antinociceptivo de IL-10, IL-4 e IL-13 na dor inflamatória. Nesse estudo observamos o efeito antinociceptivo das três citocinas nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan e incapacitação articular induzida por zymosan (ilustração 1.5), que parece ser de domínio periférico. O efeito possivelmente não deve ser mediado por opióides endógenos visto que a administração do antagonista de receptores opióides, naloxona, não foi capaz de reverter o efeito inibitório das citocinas. Foram dosados os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes no fluido articular e peritoneal estando estes diminuídos em animais tratados com IL-4, IL-10 ou IL-13. O tratamento com os anti-soros anti-IL-10, IL-4 e IL-13 amplificou tanto as contorções abdominais assim como a incapacitação articular sugerindo um papel modulador negativo endógeno para essas citocinas na dor inflamatória (ver ilustração 1.6; VALE *et al.*, 2003)

5. MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA MEDIAÇÃO DA DOR POR CITOCINAS

Como já foi dito, vem se tornando cada vez mais evidente a participação de citocinas na modulação da dor inflamatória tanto aguda quanto crônica. Foi visto que nesse processo multi-mediado há a participação de citocinas modulando positivamente ou negativamente o processo doloroso. Muitos estudos agora estão voltados para o controle da dor sob a ótica das citocinas e vem se pesquisando drogas capazes de modular a produção das mesmas. A exemplo disto a literatura cita vários tipos de drogas que inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e ou induzem a produção de citocinas como os inibidores de fosfodiesterase, talidomida e análogos, clorpromazina, corticóides, bioefetores dentre outros. No presente estudo procuramos investigar o efeito de algumas dessas drogas no controle da dor inflamatória. Procuramos dar enfoque a algumas delas.

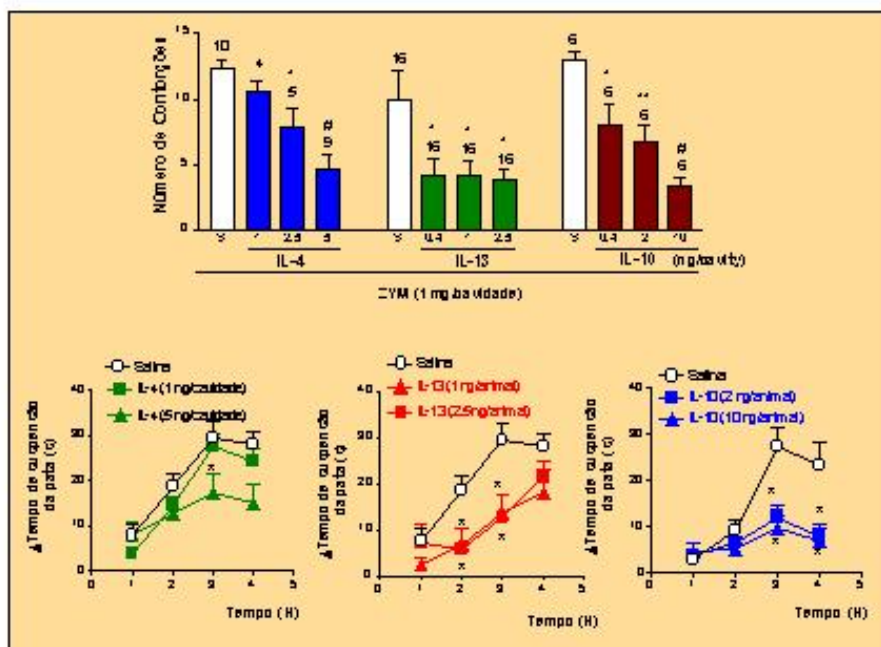


Ilustração 1.5. Efeito antinociceptivo da IL-4, IL-10 e IL-13 sobre as contorções abdominais e incapacitação articular induzida por zymosan (ZYM). Figura retrada de Vake et al., JPET 304:102-108, 2003, com permissão

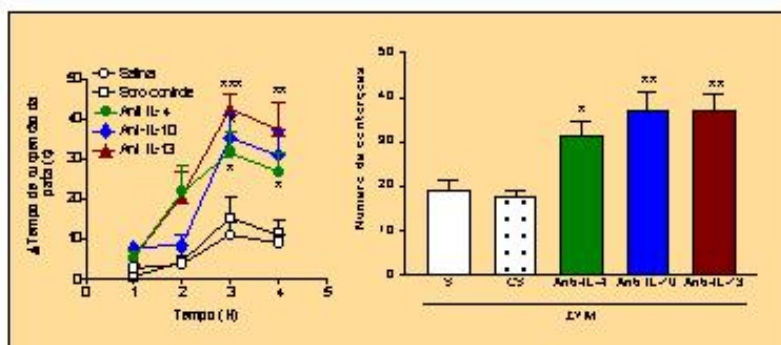


Ilustração 1.6. Efeito amplificador dos anticorpos específicos contra IL-4, IL-10 e IL-13 sobre a nocicepção induzida por zymosan nos modelos de contorções abdominais e incapacitação articular. Figura retrada de Vake et al., JPET 304:102-108, 2003, com permissão

5.1. Talidomida

A talidomida (α -N-ptalidomidoglutaramida) foi originalmente introduzida na clínica como uma droga sedativa com a vantagem de não possuir os efeitos colaterais dos barbitúricos nos anos 50 por Chemie Grunenthal (STIRILING, 1996). Após experimentos em animais em que não demonstrou efeitos tóxicos, rapidamente talidomida tornou-se um sedativo popular na Europa e Canadá, também foi utilizada como hipnótico e antiemético principalmente no tratamento da hemese matinal em mulheres grávidas. Relatos de neuropatia começaram a aparecer em 1960, com crescentes evidências de focomelia, severo defeito das extremidades e deformidade de órgãos internos em recém-nascidos. MCBRIDE (MCBRIDE, 1961) e LENZ (LENZ, 1962) foram os primeiros em documentar uma associação entre o uso de talidomida por mulheres grávidas e o repentino aparecimento de má-formação de membros e órgãos internos nos recém nascidos. Por volta de 1961, talidomida foi retirada do mercado, mas não antes que 10 a 20 mil crianças fossem afetadas. Além disso, talidomida também foi associada ao aparecimento de neuropatia periférica (DE IONGH, 1990). As propriedades teratogênicas e neurotóxicas da talidomida catalisaram o desenvolvimento da atual regulamentação da aprovação de drogas. Antes da talidomida não eram requisitados regulamentos de testes em varias espécies para detectar teratogenicidade. O efeito teratogênico da talidomida foi tardiamente revelado ser espécie específica em modelos animais, desde que foi difícil de promover má formação em ratos, camundongos, hamsters ou embriões de aves. No entanto em coelhos talidomida demonstrou induzir embriopatas parecidas com as apresentadas em fetos humanos. Coelhas tratadas com talidomida apresentaram fetos com má-formação de ossos longos (PEUCKMANN *et al.*, 2000).

A descoberta em 1965 por SHESKIN de que talidomida era uma excelente droga para tratar o eritema nodoso da lepra (ENL) ou reação do tipo II, uma condição inflamatória associada à lepra lepromatosa caracterizada por sintomas sistêmicos severos que incluem febre, lesões cutâneas dolorosas, artrite, glomerulonefrite e a presença de imunocomplexos circulantes (SHESKIN, 1965; RIDLEY, 1969) levou a conclusão de talidomida possui propriedades imunomodulatórias. Nesta complicação séria da lepra, talidomida

tem excelente efeito diminuindo a inflamação e melhorando, dramaticamente, o estado geral do paciente (BARNHILL and McDOUGALL, 1982). À partir desta descoberta inicial, em 1998, o FDA aprovou a droga para o tratamento do ENL permanecendo como droga de escolha na terapia do ENL. Posteriormente descobriu-se que o principal mediador envolvido na fisiopatologia do eritema nodoso da lepra era TNF (SARNO *et al.*, 1991)

Talidomida encontra-se sob avaliação para o tratamento de uma variedade de doenças que incluem condições que envolvem bases inflamatórias ou imunes, malignidades e complicações de infecções pelo HIV. Contudo, métodos de controle de natalidade em mulheres utilizando talidomida e os monitoramentos dos efeitos neurológicos são requisitados a todos os pacientes. O interesse nos seus efeitos anti-inflamatórios, imunomodulatórios e antiangiogênicos fez com que aumentassem o números de prescrições e pesquisas recentes demonstram resultados promissores da talidomida em pacientes com perda de peso progressiva relacionado à cânceres avançados e HIV. A terapia com talidomida também está sendo avaliada em doenças como tuberculose, sarcoidosis, úlceras aftosas da AIDS e doença de Behçet, artrite reumatóide, doença do enxerto versus hospedeiro, pyoderma gangrenosum, doença inflamatória intestinal, síndrome de Sjögren e lupus eritematoso. Estudos preliminares indicam o uso de talidomida em diversas síndromes relacionadas a cânceres avançados como caquexia, náusea crônica, insônia, transpiração abundante e dor. A descoberta de um efeito antiangiogênico provocou uma investigação de um potencial terapêutico em alguns cânceres que incluem o mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásticas, gliomas, sarcoma de Kaposi, carcinoma de célula renal, tumores de mama, colon e próstata avançados (NG *et al.*, 2002)

Mecanismo de ação da talidomida

Em 1991 SAMPAIO *et al.* reportaram que talidomida é um inibidor seletivo de TNF em monócitos humanos estimulados *in vitro* com lipopolisacarídeo e outros estímulos (SAMPALIO *et al.*, 1991). Outros dados sugerem que sua ação inibitória sobre TNF deve se a um aumento da degradação do RNAm para esta citocina (MOREIRA *et al.*, 1993), o qual a meia vida declina de 30 para 17 min, sendo assim um mecanismo de ação diferente

da pentoxifilina e dos glicocorticóides. Talidomida inibe TNF sem, no entanto afetar a produção de IL-1, IL-6 ou GMC-SF (SAMPAIO *et al.*, 1991). Contudo, dados mais recentes indicam que talidomida possui a propriedade de aumentar a produção de IL-10 em cultura de células estimuladas com LPS (CORRAL *et al.*, 1996), em soro de animais estimulados com LPS (MOREIRA *et al.*, 1997) assim como também a IL-10 endoneural em animais com neuropatia crônica constrictiva (GEORGE *et al.*, 2000). Esta propriedade, porém parece depender do modelo experimental utilizado visto que outros autores não observaram tal fato (HUIZINGA *et al.*, 1996; ROWLAND *et al.*, 1998). Outros dados também mais recentes já sugerem que talidomida inibe a produção de IL-6 o que pode explicar a neuropatia em pacientes utilizando a droga em altas dosagens durante longos períodos (CALABRESE *et al.*, 2000). Outra citocina também afetada por talidomida é a IL-8. Experimentos feitos *in vitro* demonstraram que talidomida bloqueia a produção de IL-8 por células endoteliais estimuladas com LPS, ao contrário de quando estas células são estimuladas com TNF, o qual talidomida aumenta a produção de IL-8 (DUNZENDORFER *et al.*, 1999). Talidomida também parece aumentar a cicatrização de feridas através de uma ação sobre queratinócitos onde estas células produzem mais IL-8 na presença da droga.

Talidomida além de aumentar a degradação do RNAm de TNF também é capaz de bloquear a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B o qual controla a ativação do gene do TNF. Parece que talidomida inibe a ativação de NF- κ B induzida, mas não a ativação constitutiva. A supressão de NF- κ B por talidomida está acompanhada da inibição da ligação do NF- κ B ao DNA, supressão da degradação de I- κ B α e da I- κ B α quinase (KEIFER *et al.*, 2001).

Recentemente foi descrito que talidomida inibe a angiogênese induzida por citocinas angiogênicas como o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento celular derivado do endotélio (VEGF) (D'AMATO *et al.*, 1994; KENYON *et al.*, 1997). Do ponto de vista terapêutico a inibição da angiogênese poderia levar a um impedimento do crescimento tumoral em neoplasias malignas. O crescimento de tumores sólidos é dependente da angiogênese, pois vasos sanguíneos são necessários para levar suprimento de nutrientes e oxigênio para o crescimento tumoral. O recrutamento de vasos

para o sítio tumoral leva à proliferação do tumor e permite que as células cancerígenas alcancem a corrente sanguínea para provocar metástases. O efeito anti-angiogênico da talidomida é decorrente da sua ação inibitória sobre o crescimento de células endoteliais e não um efeito citotóxico, por isso é menos provável que talidomida cause supressão da medula óssea, distúrbios gastrintestinais ou alopecia. No entanto a terapia anti-angiogênica necessita de tratamento prolongado sem interrupções (NG *et al.*, 2002).

Farmacocinética

Talidomida é um análogo sintético da glutamina. Consiste de uma estrutura contendo dois anéis com um carbono assimétrico no anel glutarimida e existe como uma mistura equilibrada de enantiômeros S(-) e R(+) que se interconvertem rapidamente em condições fisiológicas. O anel glutaramina é supostamente responsável pelo seu efeito sedativo e hipnótico enquanto que o isômero S tem sido relacionado com o seu efeito teratogênico (THOMAS e KANTARJIAN, 2001). Foi descrito que a talidomida encaixa no modelo farmacocinético de primeira ordem (FIGG *et al.*, 1999). A pouca solubilidade da droga em solução aquosa faz com que sua bioavaliação seja desconhecida e a formulação i.v. impossível. Quando dada por via oral talidomida tem meia vida de absorção de 1.7 ± 1.05 h, com o pico de concentração no plasma é alcançado aproximadamente com 4 - 5 h (TEO *et al.*, 2000). A meia vida de eliminação é de aproximadamente 8.7 ± 4.1 h (TSENG *et al.*, 1996), podendo variar com a dosagem de talidomida administrada (PISCITELLI *et al.*, 1997; FIGG *et al.*, 1999). A droga é metabolizada principalmente por clivagem enzimática hidrolítica, contudo a biotransformação catalisada pelo citocromo p450 também ocorre (MEYRING *et al.*, 2000). Menos de 1% é excretada na urina, no entanto alguma parte da droga sofre clearance na bile (RADOMSKY e LEVINE, 2000). Há pelo menos 1 metabólito formado por hidroxilação da droga: 5'-OH talidomida que pode ser o responsável pelo seu efeito antiangiogênico (BAUER *et al.*, 1998)

Efeitos adversos

Os efeitos adversos mais comuns da talidomida são sonolência e vertigem. Para minimizar essas complicações talidomida deve ser administrada

em uma dose única no final do dia. O efeito tóxico mais conhecido da talidomida é a teratogenicidade que pode acontecer mesmo com uma única dose. A teratogenicidade a talidomida é conhecida como focomelia defeitos severos os membros e deformidade dos órgãos internos. Focomelia é mais comum nos membros superiores 65 - 75% dos casos. Em 10 -25% dos casos os membros superiores e inferiores são afetados e em 2-5% somente as pernas são afetadas (STEPHENS *et al.*, 2000). Em adição o uso da droga por mulheres grávidas pode levar à amelia, hipoplastia, deformidades do ouvido externo e defeitos cardíacos congênitos nos recém nascidos. O período crítico da administração da talidomida ocorre 34 a 50 dias após o último período menstrual (QUILITZ, 1999). O mecanismo teratogênico da talidomida permanece obscuro, no entanto mais de 30 hipóteses já foram aventadas. Foi descrito que o efeito antiangiogênico da talidomida coincide com a teratogenicidade, mas não o efeito sedativo ou imunomodulatório, e parece ser independente da sua habilidade de inibir a produção de TNF. A teoria mais aceita é a de que talidomida intercala o DNA e também pode causar dano ao DNA por oxidação através de radicais livres (NG *et al.*, 2002)

Terapias crônicas com talidomida demonstraram produzir neuropatia periférica que começa com um adormecimento dos dedos do pé e depois uma perda sensorial superficial em pés e mãos. Se a terapia não for descontinuada as parestesias dos pés e mãos progridem até se tornarem permanentes. Além disso, já foram observadas neutropenia, fotossensibilidade, e vários efeitos endócrinos, sendo estes os efeitos adversos menos comuns da talidomida.

Talidomida e Dor

Antes do descobrimento dos efeitos teratogênicos da talidomida, a droga foi utilizada como analgésica em um estudo e bons resultados foram obtidos na dor associada a inflamação, dor pós-operatória, e dor do câncer (MILLER *et al.*, 1960). Em 1966 talidomida foi usada no tratamento da neurite leprótica (BELDA *et al.*, 1996). Pacientes HIV positivos com síndromes hiperalgésicas da boca e faringe refratários a analgésicos comuns foram tratados com talidomida e obtiveram alívio completo da dor (GEHANNO *et al.*, 1990). Talidomida também se mostra eficiente na inibição da dor neuropática no modelo de injúria por contração crônica onde foi capaz de inibir a produção

de TNF endoneural assim como aumentou a produção de IL-10 endoneural e teve um efeito modulatório positivo sobre a metil encefalina do corno dorsal da medula espinhal (SOMMER *et al.*, 1998; GEORGE *et al.*, 2000).

Uma revisão da literatura recente descreve o uso potencial da talidomida no controle da dor (PEUCKMANN *et al.*, 2003). Neste trabalho PEUCKMANN e cols. relatam que até a presente data não há ensaios clínicos especificamente designados para explorar o potencial analgésico da talidomida sugerindo a realização de estudos à cerca dos possíveis benefícios dessa droga nas condições dolorosas que pouco respondem ao tratamento convencional como a dor neuropática, neuralgia pós herpética ou então o fenômeno de dor central. Devido ao seu mecanismo de ação que é distinto de outras drogas como esteroides, talidomida oferece a possibilidade de um tratamento combinado com outras drogas sem a sobreposição dos efeitos tóxicos (PEUCKMANN *et al.*, 2003).

Outro estudo recente aponta a inibição de TNF como sendo de extrema importância no controle da dor crônica (PARADA *et al.*, 2003). Os autores descrevem que a inibição experimental de TNF pelo seu anticorpo ou por talidomida é capaz de inibir a hiperalgesia latente, que consiste de um estado nociceptivo observado após a injeção de PGE₂ decorridos cinco dias da indução da hiperalgesia aguda por carragenina. Este tipo de hiperalgesia é independente da ação de células residentes (e liberação de mediadores por estas), dura mais de 24 horas, diferente da hiperalgesia inflamatória aguda, e não é inibida por indometacina. Foi observado que a hiperalgesia latente era dependente de receptores presentes em fibras sensitivas aferentes ao corno dorsal da medula espinhal e que a perda de receptores TNFR1 inibia o surgimento de tal hiperalgesia. Os autores propuseram que a ativação dos receptores TNFR1 presente nas fibras por TNF desencadearia o processo nociceptivo que seria de característica crônica e que drogas inibidoras de tal condição seriam de extrema relevância no controle da dor crônica (PARADA *et al.*, 2003).

Dentre outros objetivos o presente trabalho avalia a atividade analgésica da talidomida focando o seu efeito sobre TNF na dor inflamatória aguda experimental assunto pouco estudado mais de importante relevância.

5.2. Análogos da talidomida

A atividade clínica da talidomida e a importância da inibição do TNF levou a busca de inibidores de TNF que não possuíssem efeitos adversos ou teratogênicos. Neste intuito novos compostos com essas propriedades vem sendo desenvolvidos e testados. Foram sintetizados uma série de análogos da talidomida derivados do ácido β -amino- β -arilproanóico que são potentes inibidores de TNF (MULLER *et al.*, 1996). Estudos posteriores revelaram estes compostos potentes inibidores da fosfodiesterase do tipo 4 (Muller *et al.*, 1998) enzima presente principalmente em macrófagos e monócitos e que é conhecidamente inibidora da adenil ciclase assim aumentando o nível de AMPc intracelular resultando na inibição da síntese de TNF.

Um trabalho mais recente demonstrou a descoberta de 3 novos potentes inibidores de TNF: (1) um deles por substituição a porção 4-amino da talidomida, (2) o EM-12 e (3) a α -metil-talidomida. O análogo (S)-4-amino substituído demonstrou ser ~15,000 vezes mais potente do que a talidomida em inibir a produção de TNF em monócitos humanos estimulados por LPS. O análogo amino substituído EM-12 demonstrou ter 4 isômeros, mas apenas um deles possui atividade inibitória sobre TNF. O análogo α -metil da talidomida também possui atividade inibidora da síntese de TNF e não possui o centro quiral racemizável encontrado na talidomida. Nenhum dos os três análogos demonstrou atividade inibitória significativa sobre a fosfodiesterase 4 (MULLER *et al.*, 1999).

5.3. Pentoxifilina

A pentoxifilina, 1-(5-oxohexil)-3,7-(dimetilxantina) é o análogo da metilxantina teobromina. Foi inicialmente caracterizada como agente hemorreológico para o tratamento de doenças vasculares periféricas (Muller, 1981) e claudicação intermitente (ACETTO, 1982; PORTER *et al.*, 1982). Foi proposto que pentoxifilina altera a flexibilidade da membrana de hemácias permitindo assim o seu acesso através dos microcapilares que possuem menos da metade do diâmetro da célula. Esse efeito também é atribuído a sua

capacidade de aumentar a produção de prostaciclina (PGI₂) pela parede vascular e de aumentar a produção de AMPc em plaquetas, leucócitos e monócitos. Acredita-se que pentoxifilina por reduzir a viscosidade do sangue, diminuir a agregação de células vermelhas do sangue e plaquetas e reduzir os níveis de fibrinogênio, permite uma melhora da circulação e assim previne os ataques isquêmicos característicos da claudicação intermitente (SMITH *et al.*, 1989).

Mecanismo de ação

Geralmente é assumido que pentoxifilina exerce seu efeito farmacológico por inibir as fosfodiesterases do AMPc intracelular, portanto aumentando a concentração intracelular de AMPc. Diversos estudos relatam que efeito modulatório da pentoxifilina sobre a rede de citocinas é possivelmente devido à capacidade de elevar o nível de AMPc intracelular assim reduzindo a atividade fagocítica, produção do íon superóxido, e liberação de enzima lisossomal por polimorfonucleares (BESSLER *et al.*, 1986).

Em 1988 STRIETER e Cols demonstraram que pentoxifilina inibe a síntese de TNF induzida por LPS por inibir a transcrição de seu gene assim como também por aumentar a degradação do RNAm para tal citocina. Estudos posteriores demonstraram que pentoxifilina inibe a síntese de TNF apenas na sua fase transcricional não interferindo na degradação do RNAm (DOHERTY *et al.*, 1991). Nesse trabalho os autores avaliaram a o efeito inibidor da pentoxifilina sobre a produção de TNF induzido por LPS *in vitro* e *in vivo*. Os mesmos autores e outros associam a atividade farmacológica da pentoxifilina com a sua ação inibitória sobre a fosfodiesterase do AMPc (DOHERTY *et al.*, 1991; BESSLER *et al.*, 1986). Vários estudos apontam que o aumento da concentração intracelular de AMPc inibe a síntese de TNF *in vitro* (TANNENBAUM and HAMILTON, 1989; TAFFET *et al.*, 1989). Outros agentes que aumentam a concentração intracelular de AMPc (como o dibutilil AMPc e a toxina da cólera) também demonstraram atividade inibitória sobre a transcrição do gene do TNF e acúmulo de proteína (TANNENBAUM and HAMILTON, 1989). Já foi observado também que pentoxifilina inibe a produção de TNF por macrófagos alveolares humanos *in vitro* (MARQUES *et al.*, 1999) assim como a

produção de TNF *in vitro* e *in vivo* em pacientes com o eritema nodoso da lepra (SAMPAIO *et al.*, 1998).

No entanto, a inibição da fosfodiesterase somente não explica cada um dos efeitos complexos da pentoxifilina. Teofilina, outra xantina que também inibe a fosfodiesterase com a mesma equipotência, demonstrou-se menos eficaz em inibir a atividade metabólica de polimorfonucleares (PARK *et al.*, 1971). Diferente da pentoxifilina, teofilina em concentrações equimolares não exerceu atividade inibitória sobre células assassinas (REED and DEGOWIN, 1992). Os níveis de AMPc alcançados pela administração de 500 a 1000mg/ml de pentoxifilina estão bem abaixo do que é necessário para inibir quimiotaxia e produção de superóxido por polimorfonucleares (CONFER and EATON, 1982).

Então o mecanismo de ação exato da pentoxifilina ainda não está esclarecido. Apesar de originalmente se pensar que pentoxifilina inibia exclusivamente a produção de TNF, há evidências crescentes de que pentoxifilina também afeta a produção e atividade de outras citocinas como: IL-1 (SULLIVAN *et al.*, 1988), IL-6 (SCHANDENE *et al.*, 1992), GM-CSF (MOREIRA *et al.*, 1993), IFN- γ (THANHÄUSER *et al.*, 1993) e IL-2 (THANHÄUSER *et al.*, 1993, ALEGRE *et al.*, 1991). No entanto dados relacionados a outras citocinas que não o TNF ainda são parcialmente controversos. Por exemplo, tem sido descrito que a liberação de IL-6 não é afetado por pentoxifilina (ZABEL *et al.*, 1989), enquanto outros pesquisadores observaram o aumento da liberação de IL-6 por pentoxifilina (SCHANDENE *et al.*, 1992).

Em 1994 NEUNER *et al.* observaram o efeito da pentoxifilina na produção de citocinas (TNF, IL-1, IL-6 e IL-8) em células mononucleares periféricas sanguíneas humanas com tratamento *in vitro* e *in vivo*. Tal estudo demonstrou que quando as células eram obtidas de indivíduos normais e cultivadas, *in vitro*, com pentoxifilina, uma inibição da liberação de TNF era observada, enquanto que IL-1 β e IL-8 não eram afetadas e a secreção de IL-6 estava significativamente aumentada. Esses dados, *in vitro*, encontram-se de acordo com outros autores (SCHANDENE *et al.*, 1992; MOREIRA *et al.*, 1993), entretanto os dados *in vivo* mostraram-se diferentes. Quando as células eram colhidas de indivíduos que foram tratados com pentoxifilina houve uma inibição da liberação de todas as citocinas. Os autores teorizam que em sistemas *in*

vivo outros mediadores podem estar agindo influenciando o resultado. Outra explicação seria a que houve inibição das citocinas somente quando os indivíduos eram tratados com pentoxifilina por diversos dias. Foi feito um experimento *in vitro* mimetizando essas condições observadas *in vivo* e assim foram obtidos resultados semelhantes. Também foi feito um estudo para saber se o efeito inibitório da pentoxifilina *in vivo* era regulado a nível transcricional. As células estimuladas com LPS e tratadas *in vivo* com pentoxifilina tiveram o RNA extraído e foi observado a inibição da expressão do RNAm para todas as citocinas (NEUNER *et al.*, 1994).

Além de inibir a síntese de citocinas o potencial antiinflamatório da pentoxifilina também pode ser explicado por sua inibição da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) *in vitro* e *in vivo* (NEUNER *et al.*, 1997), além de sua controversa ação sobre a produção de óxido nítrico (PARK *et al.*, 2001; LOFTIS *et al.*, 1997; BESHAY *et al.*, 2001; LAUTERBACH *et al.*, 1995). Parece que sua atuação sobre a produção de NO depende do tipo celular estudado (TRAJKOVIC *et al.*, 1997).

Farmacocinética

Em humanos, após administração oral, a pentoxifilina é rapidamente absorvida. Uma dose única oral de pentoxifilina produz pico de concentração no soro de cerca de 1100 ug/l de droga não metabolizada e cerca de 1.900 ug/l de seu primeiro metabólito a hidroxipentoxifilina. Preparações orais possuem apenas 20 a 30% de biodisponibilidade por causa do alto clearance de primeira passagem. Em voluntários saudáveis pentoxifilina é eliminada da circulação com uma meia vida de eliminação de 0.9 horas após administração oral e cerca de 1 a 1.6 horas após administração intravenosa. As transformações metabólicas são responsáveis pela baixa e variável biodisponibilidade da droga, e menos de 1% da dose é excretada de forma inalterada na urina. Além da transformação metabólica observada no fígado o próprio sangue pode ser capaz de metabolizar pentoxifilina. Sete metabólitos de pentoxifilina são conhecidos, mas hidroxipentoxifilina e carboxipentoxifilina são os 2 compostos mais presente em humanos (SMITH *et al.*, 1986).

Efeitos adversos

Numerosos estudos com pentoxifilina demonstraram sua segurança e efeitos adversos mínimos mesmo quando administrada durante longos períodos. Distúrbios gastro-intestinais ocorre em menos de 2.6% dos pacientes, efeitos adversos cardiovasculares, psicológicos hepáticos e dermatológicos ocorrem em menos de 0.25% dos pacientes. Estudos farmacocinéticos com pentoxifilina IV em indivíduos saudáveis mostraram que os efeitos adversos predominantes da pentoxifilina foram náuseas e vômitos assim como nos indivíduos com distúrbios hematológicos (WINDMEIER e GRESSNER, 1997).

Pentoxifilina e dor

A atividade analgésica da pentoxifilina foi pouco estudada, contudo há relatos na literatura acerca do assunto. A maioria trata do efeito analgésico observado no tratamento da claudicação intermitente. Mas, já foi demonstrado o efeito da pentoxifilina na hiperalgesia pós-injúria em ratos e em dor pós-operatória em humanos. Neste estudo o pré-tratamento com pentoxifilina foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida por formalina, onde foi proposto que a atividade antinociceptiva da droga seria de maneira indireta devido à inibição da cascata de citocinas induzida pós-injúria. Foi observado também que pacientes que recebiam pentoxifilina no pré-operatório tiveram uma menor requisição de opióides do que o grupo controle (WORDLICZECK *et al.*, 2000). Outro artigo estuda o efeito benéfico da pentoxifilina no tratamento da dor ciática experimental devido a herniação discal (YABUKI *et al.*, 2001).

5.4. Clorpromazina

Clorpromazina, uma fenotiazina (derivado de metilxantina) e antagonista do cálcio, é um neuroléptico comumente usado em desordens psiquiátricas. O efeito imunomodulatório de medicamentos antipsicóticos foi descrito desde a década de 50. Logo após a introdução de clorpromazina na prática clínica esta demonstrou proteger camundongos do choque séptico induzido por lipopolissacarídeo (CHEDID, 1954). Paralelamente a isso foi relatada a sua propriedade tuberculostática em humanos (GEIGER and FINKELSTAIN, 1954;

FISHER and TELLER, 1959;). Em adição, efeitos colaterais da clorpromazina e outras fenotiazinas como agranulocitose (PISCIOTTA, 1969), trombocitopenia (ZUCKER *et al.*, 1990) e indução de lupus eritematoso sistêmico (DUBOIS *et al.*, 1972; ANANTH and MINN, 1973) suportam a idéia de que essa classe de drogas antipsicóticas é potente moduladora de funções imunes.

O efeito protetor de clorpromazina no choque séptico induzido por LPS foi estudado e foi associado à inibição da produção de TNF (GADINA *et al.*, 1991; MENGOZZI *et al.*, 1994). Clorpromazina também inibe síntese de TNF induzida por diferentes estímulos como a injúria hepática por concavalina A (IKEDA *et al.*, 1997), bactérias gram positivas inativadas por calor (MENGOZZI *et al.*, 1994), e durante infecção com *klebsiella pneumoniae* ou *Candida albicans* (NETEA *et al.*, 1995). De fato clorpromazina inibe, *in vitro*, a síntese e a citotoxicidade de TNF por monócitos humanos (ZINETTI *et al.*, 1995).

Os efeitos de clorpromazina na liberação de outras citocinas são menos freqüentemente investigados. Contudo há relatos da inibição de IL-1 β induzida por enterotoxina B de estafilococo (SEB) ou endotoxina (NETEA *et al.*, 1995; TARAZONA *et al.*, 1995). Em adição SEB induz a liberação de IL-2, IFN-gama, IL-4 e GM-CSF os quais também são inibidos por clorpromazina (TARAZONA *et al.*, 1995). Em contraste com supressão de algumas citocinas pró-inflamatórias clorpromazina demonstrou uma atividade estimulatória sobre a produção da citocina antiinflamatória IL-10 em resposta a endotoxina, SEB e concavalina A (MENGOZZI *et al.*, 1994; TARAZONA *et al.*, 1995; IKEDA *et al.*, 1997).

Em adição a seus efeitos sobre a produção de citocinas clorpromazina possui inúmeras atividades farmacológicas: é antagonista de receptor de histamina e de 5-HT, é antagonista de adrenoceptor, inibidora de fosfolipase A2 e tem atividade antioxidante. Alguma dessas ações podem explicar a inibição da produção de TNF, e de fato outros antagonistas de 5-HT, de receptor alfa (não Beta) adrenérgico, antagonista de histamina e inibidores da fosfolipase A2 inibem a produção de TNF, *in vivo*, induzido por LPS. Outro estudo semelhante mostrou o efeito de drogas anti-serotoninérgicas, anti-dopaminérgicas, anti-colinérgicas, anti- β -adrenérgicas, anti- α -adrenérgicas, anti-histamínicas, depletoras de catecolamina inibidoras de fosfolipase A₂, inibidoras de cicloxigenase, inibidoras de lipoxigenase e inibidoras de

lipo/cicloxygenase) sobre a produção de TNF induzida por LPS em animais normais ou adrenalectomizados. A adrenalectomia foi realizada para excluir a possibilidade de alguma droga estar agindo por induzir a produção de corticóide. Foi observado que todas as drogas inibem a produção de TNF exceto os antagonistas β adrenérgicos e a indometacina (inibidor de cicloxygenase) que ao invés de inibir aumentou em até 100% os níveis de TNF. Clorpromazina também foi estudada e foi capaz de inibir a produção de TNF em animais adrenalectomizados (GHEZZI *et al.*, 1996).

Outro estudo procurou demonstrar o mecanismo de inibição da produção de TNF da clorpromazina utilizando artifício diferente. Foram sintetizadas diferentes análogos da clorpromazina e analisadas as suas habilidades para inibir a produção de TNF. Derivados quaternários da clorpromazina foram desenvolvidos com o objetivo de se obter moléculas incapazes de passar a barreira hematoencefálica para que assim não tivessem atividade no sistema nervoso central. Todos os derivados inibiram a produção de TNF, uns mais outros menos. Foi observado que a perda do efeito sedativo não influenciou na inibição da síntese de TNF. Foi avaliada a afinidade dos análogos por alguns receptores importantes no mecanismo de ação da clorpromazina e foi visto que houve uma redução da afinidade por todos os receptores testados, mas em diversas ordens de magnitude. Os autores propuseram que os efeitos anti-noradrenérgico, anti-dopaminérgico e anti-serotoninérgico não são essenciais para o efeito inibitório sobre a síntese de TNF. A respeito da propriedade inibitória da clorpromazina sobre a fosfolipase A_2 , dois análogos que não demonstraram nenhuma inibição da enzima obtiveram ótimos resultados inibitórios sobre a produção de TNF. Resultados dissociativos similares foram observados entre atividade inibidora do TNF e o efeito na atividade da NO sintase. Finalmente ao experimentar a atividade antioxidante dos análogos foi visto que há uma correlação entre a atividade antioxidante e a inibição de TNF. Um dos compostos que não apresentava tal atividade também teve fracasso ao inibir a produção de TNF. Com isso foi sugerido que a atividade antioxidante da clorpromazina tem um importante papel na inibição da produção de TNF induzida por LPS (GHEZZI *et al.*, 1996).

Uma revisão atual sobre o efeito de drogas antipsicóticas na produção de citocinas dá destaque á clorpromazina e são comentados os possíveis

mecanismos de ação dessa fenotiazina sobre a rede de citocinas. Há poucos artigos, portanto tal mecanismo de ação a nível celular e subcelular ainda são desconhecidos. Contudo, há evidências sugerindo que o aumento da produção de IL-10 por clorpromazina deve envolver o receptor D1 da dopamina (TARAZONA *et al.*, 1995) e que seu efeito sobre as citocinas pró-inflamatórias está longe de ser atribuído a um só receptor de neurotransmissor. Em adição ao bloqueio de neuroreceptor inúmeros outros efeitos das fenotiazinas podem contribuir para alterar a produção de citocinas como a inibição da proteína, quinase C, fosfolipase A e C e calmodulina. Uma esperança de se desvendar o mecanismo de ação das drogas neurolépticas na produção de citocinas seria os estudos *in vitro* utilizando várias células imunocompetentes. Mas os poucos estudos realizados nesse sentido obtiveram resultados que são inconsistentes com o efeito das drogas *in vivo*. Essas discrepâncias sugerem que a imunomodulação por drogas antipsicóticas *in vivo* envolve mecanismos que não são efetivos, *in vitro*, como a presença de metabólitos produzidos pelo fígado, outras células que não as imunocompetentes são também capazes de sintetizar citocinas, a produção de citocinas pode ser modulada indiretamente por neurotransmissores agindo no SNC para a liberação de outras substâncias que então interfeririam com a rede de citocinas (POLLMÄCHER *et al.*, 2000).

Clorpromazina e dor

Há poucos dados na literatura sobre a atividade analgésica da clorpromazina. A maioria dos artigos contendo tal informação são estudos clínicos e relatos de casos. Foi visto que clorpromazina parece ter bons resultados no tratamento da enxaqueca (ISERSON, 1983; KELLY *et al.*, 1997), no tratamento da dor crônica (MEHL-MADRONA, 1999; MERSKEY, 1997) e da dor do membro fantasma (LOGAN, 1983). O papel analgésico da clorpromazina em modelos experimentais também foi pouco estudado, Demonstrou-se que clorpromazina inibe a hiperalgesia induzida por estresse na dose de 5 mg/kg medida no modelo de retirada da cauda em ratos (JAKOUBEK, 1984). Contudo outro estudo utilizando o mesmo modelo clorpromazina não inibiu a resposta nociceptiva induzida por estímulo ultrassônico enquanto que morfina, acetaminofeno, flubiprofeno e indometacina foram capazes de diminuir tal nocicepção (MOHRLAND, 1983).

5.5. Agentes Biológicos

Cada vez mais vem se estudando o efeito de substâncias biológicas em doenças de difícil cura como as auto-imunes e dor crônica. Dentre essas substâncias as mais estudadas são as capazes de inibir a atividade de citocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, a produção aumentada de TNF está associada a inúmeras condições patológicas e isso levou a busca de caminhos para a sua neutralização ou inibição de seus efeitos. Muitas drogas são usadas, como as que já comentamos, além das drogas imunossupressoras como a ciclosporina A e a dexametasona que demonstram atividade inibitória sobre TNF, mas inúmeros efeitos colaterais. Na medida que entendemos mais sobre os mecanismos envolvidos na produção do TNF, e sua ação em células, mais estratégias específicas estão surgindo. Isto está levando tanto ao desenvolvimento de novos agentes e novas drogas assim como a modificação das existentes para que se diminuam os efeitos tóxicos, as torne mais potentes e mais específicas.

Anticorpo anti-citocinas

Os anticorpos anti-TNF vem sendo utilizados para tratar condições associadas com alto nível de TNF. Inicialmente isto foi demonstrado pelo uso de imunização passiva para prevenir a endotoxemia em camundongos (BEUTLER *et al.*, 1985). Entretanto resultados mistos foram obtidos durante estudos preliminares de fase III em humanos quando anticorpo monoclonal anti-TNF murino foi usado para tratar pacientes com condições em que o TNF estava associado com a patogênese (EXLEY *et al.*, 1990; KWIATKOWSKI *et al.*, 1993; HERVE *et al.*, 1992). Esses estudos demonstraram que inicialmente havia uma melhora dos pacientes durante o tratamento, mas depois uma regressão.

Ultimamente vêm sendo desenvolvidos anticorpos quiméricos anti-TNF usando engenharia genética. Estudos clínicos foram realizados para testar sua tolerabilidade e poder de neutralização do TNF. Os estudos clínicos começaram com o uso do Infliximab, inicialmente chamado de cA2, um anticorpo monoclonal murino quimérico Fv humanizado que liga-se com alta afinidade ao TNF humano. Estudos de fase III mostraram a eficácia do

Infliximab no tratamento da artrite reumatóide onde houve uma redução de 60-70% dos sintomas e pelo menos 79% dos pacientes obtiveram melhora com a maior dose em comparação com o grupo placebo (ELLIOTT *et al.*, 1994). Entretanto o tratamento prolongado teve uma eficácia limitada podendo ser associado a alto grau de clearance do Infliximab infundido ou desenvolvimento de anticorpos que impediriam a sua ligação ao TNF. Posterior estudo de fase III demonstrou ser o primeiro de duração suficiente para avaliar a terapia anti-TNF na arquitetura da articulação (MAINI *et al.*, 1999).

A eficácia no tratamento clínica da dor ciática também foi avaliada. Constatou-se que em pacientes com dor ciática severa causada por herniação discal o tratamento com Infliximab reduziu em 50% a dor na perna com 1 hora de administração, com 2 semanas 60% dos pacientes tiveram redução da dor aumentando e 3 meses após o tratamento 90% dos pacientes relatavam redução da dor (KARPPINEM *et al.*, 2003). O mesmo agente também mostrou benefícios quando usados para tratar pacientes com doença de Crohn ativa, a qual é associada com elevado TNF além de outras citocinas. Em um estudo clínico fase III uma única infusão de Infliximab induziu melhora constatada por endoscopia em 80% dos pacientes com doença corticoide-resistente (VAN DULLEMEN *et al.*, 1995) que persistiu em 41% dos pacientes tratados com Infliximab comparado a 12% do grupo placebo (TARGAN *et al.*, 1997).

Outra citocina que também é alvo dos estudos anti-citocina é a IL-1. Quando IL-1 foi bloqueada a administração de IL-1ra (Anakinra – Amgen) em um estudo multicentro randomizado e duplo-cego controlado com pacientes portadores de artrite reumatóide houve resultados positivos mas menos dramáticos do que os obtidos com a terapia anti-TNF. Eles revelaram uma melhora clínica de acordo com os conceitos do ACR e as observações radiológicas (BRESNIHAN *et al.*, 1998; JIANG *et al.*, 2000; WATT and COBBY, 2001). Este agente foi recentemente aprovado pelo FDA para uso no tratamento da artrite reumatóide.

Em modelos animais há evidências consistentes do envolvimento das duas citocinas tanto na artrite como em outras doenças autoimunes assim como também na dor já havíamos comentado antes. Um estudo recente em modelo experimental de dor neuropática mostra que o tratamento com uma mistura de anticorpo anti-TNF e anti-IL-1 induz uma melhora acentuada da dor

do que quando a terapia é efetuada somente com um dos anticorpos (SCHÄFERS *et al.*, 2001).

IL-6 também foi alvo de estudos principalmente no que diz respeito a artrite reumatóide. Em um estudo clínico a administração de um anticorpo murino anti-IL-6 humana demonstrou uma melhora de curta duração, no entanto o numero de pacientes utilizados foi pequeno. Em outro estudo clínico controlado a administração de anticorpo monoclonal humanizado também induziu melhora dos sintomas em pacientes com artrite reumatóide havendo a normalização dos níveis de proteínas de fase aguda dentro de 2 semanas (YOSHIZAKI *et al.*, 1998). Contudo o efeito dos tratamentos anti-IL-6 parecem ser mais lentos do que os observados com TNF o que parece razoável, visto que TNF é o possível iniciador de uma cascata de citocinas na qual IL-6 está inserida além de outras.

Receptores solúveis

As citocinas exercem suas ações biológicas por meio da ligação com seus receptores presentes nas células. O TNF, por exemplo, exerce suas atividades através de dois receptores distintos, TNFR1 (p55 ou CD120a) e TNFR2 (p75 ou CD120b) que pertencem a uma super-família de receptores homólogos (ver ilustração 1.7): TNFR1, TNFR2, receptor para linfotoxina (LT β R), Fas (CD95), CD40, receptores para o NGF, RANK, TRAIL. Algumas evidências mostram que o TNF de membrana liga-se preferencialmente ao TNFR2 enquanto que a forma solúvel de TNF parece ter alta afinidade pelo receptor TNFR1 (VANDENABEELE *et al.*, 1995).

Quando clivados os domínios extracelulares de ambos receptores podem ser detectados como formas solúveis (sTNFR1 e sTNFR2). Os receptores solúveis do TNF agem bloqueando as ações desta citocina por se ligarem diretamente ao TNF impedindo que este interaja com o TNFR1 ou TNFR2 de membrana (ver ilustração 1.7). A função exata dos receptores solúveis do TNF ainda não está clara, entretanto, foi sugerido que concentrações fisiológicas de sTNFRs são capazes de estabilizar a molécula de TNF, potenciando suas ações a longo prazo. Entretanto quando presente em altas concentrações os sTNFR são capazes de inibir os efeitos do TNF. Diversos estudos demonstram níveis elevados de sTNFR no soro de pacientes

com artrite reumatoide (TOUSSIROT *et al.*, 1994; HIDAKA *et al.*, 2001; KLIMIUK *et al.*, 2001).

Outro agente anticitocina de ocorrência natural é o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). Semelhante ao sTNFR, IL-1ra inibe a atividade da IL-1 competindo pela ligação ao seu receptor sem no entanto induzir uma resposta. sTNFR e IL-1ra são proteínas de ocorrência natural presentes no soro de pacientes com artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias.

Em um modelo experimental de dor neuropática em rato o tratamento com o IL-1ra e o sTNFR inibiu a alodinia de forma bastante significativa, demonstrando ausência de tolerância e efeitos colaterais como se observa comumente com o uso de opióides (SWEITZER *et al.*, 2001). O efeito dos receptores solúveis de TNF e IL-1 também foi estudada na inflamação pulmonar aguda induzida pela injeção intratraqueal de lipopolissacarídeo e observou-se que houve uma inibição da infiltração de neutrófilos na lavagem broncoalveolar e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (ULICH *et al.*, 1994). Estudos clínicos foram realizados utilizando um novo agente terapêutico que age de maneira similar ao sTNFR. O Etanercept uma proteína solúvel, dimérica, recombinante composta pelo domínio extracelular dos dois receptores humanos p75 do TNF fusionados à porção Fc do IgG1 humano, mostrou excelentes resultados no tratamento da artrite reumatóide em estudos randomizados, placebo controlados em crianças e adultos. Etanercept causou melhora geral dos pacientes inclusive da dor, com demonstração radiológica quando dado sozinho ou em combinação com o metotrexato, além de causar poucos efeitos adversos (MORELAND *et al.*, 2002). Outros dados demonstram o efeito do etanercept no controle da dor onde foi observada a atividade anti-hiperalgesica na dor neuropática experimental induzida pela injúria por constrição crônica do nervo ciático (SOMMER *et al.*, 2001).

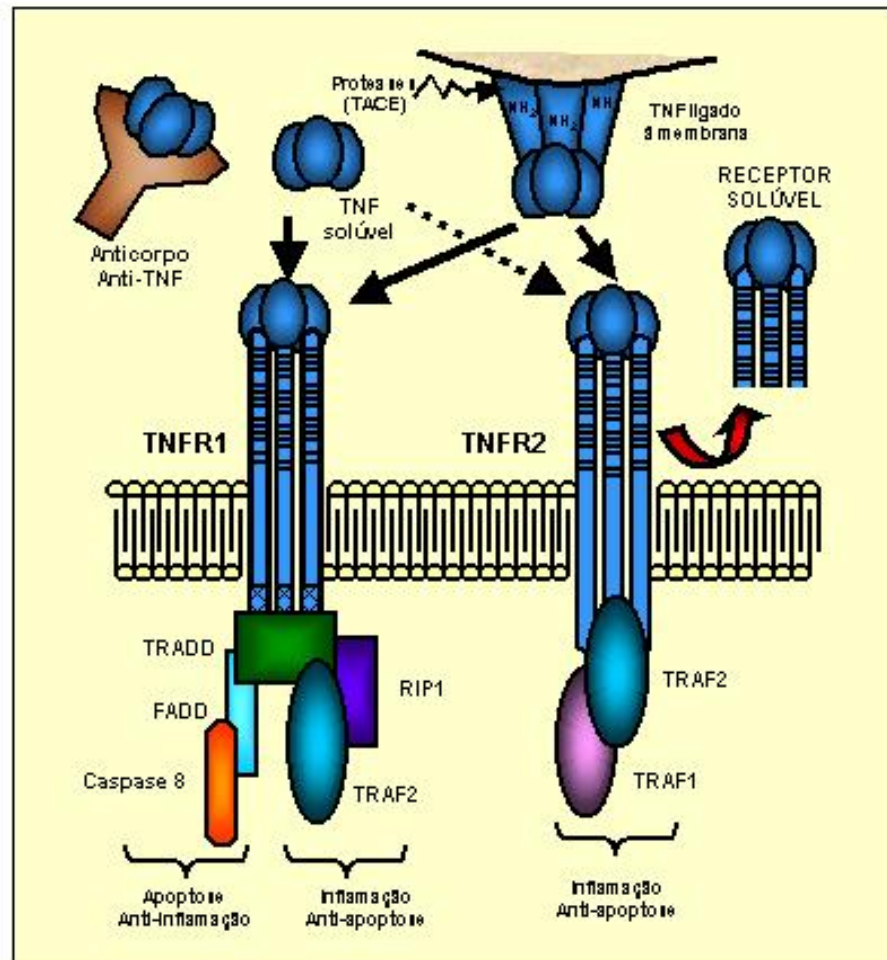


Ilustração 1.7. Fator de necrose tumoral (TNF) e a sinalização através dos subtipos de receptores TNFR1 e TNFR2 (receptor para o TNF tipo 1 e 2). TRADD (proteína associada ao domínio de morte do TNF); FADD (proteína associada ao domínio de morte do Fas); TRAF (fator associado ao receptor do TNF); RIP1 (proteína interativa do receptor 1). Adaptado de D.J. McEwan / Cellular Signaling 14 :477-492 (2002)

6. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Em face ao exposto, ficou estabelecido que as drogas apresentadas talidomida, pentoxifilina e clorpromazina além de outras atividades são imunomoduladoras e são descritas como inibidoras do processo inflamatório. Esta característica comum entre as drogas deve-se principalmente ao fato de modularem a produção de citocinas, principalmente as chamadas de pró-inflamatória, dentre elas o TNF. Esta citocina já foi extensivamente estudada e mostra fundamental importância no desenvolvimento da resposta nociceptiva. Contudo, no campo da dor inflamatória a atividade analgésica destas drogas é ainda pouco abordada e o que está descrito na literatura limita-se a casos clínicos e modelos de dor neuropática sem muita especulação sobre o mecanismo de ação dessas drogas. Ademais até o início deste trabalho a atividade antinociceptiva destas drogas em modelos experimentais de dor inflamatória ainda não havia sido demonstrada.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina, e clorpromazina na dor inflamatória experimental assim como os mecanismos e mediadores envolvidos nesta atividade.

Especificamente procurou-se avaliar, na atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina e clorpromazina, o papel de células residentes (macrófagos e mastócitos) e das citocinas que possivelmente estão sendo liberadas por estas células ativando ou inibindo a nocicepção.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

1.1. Camundongos e Ratos

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25 e 30 gramas, e ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, pesando entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – Universidade Federal do Ceará e Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia dessa mesma universidade e do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso a ração e água

2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos nomeados a seguir:

- Aparelho para medir a incapacitação articular (gentilmente cedido e elaborado pelo Prof. Marcus R. Vale e adaptado pelo Prof. Airton Rocha do Depto. de Fisiologia e Farmacologia- UFC,)
- Aparelho utilizado no teste da placa quente (gentilmente cedido pelo Prof. Vietla S. Rao, Depto. de Fisiologia e Farmacologia- UFC)
- Aparelho utilizado para medir a hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-Selitto modificado), gentilmente cedido pelo Prof. Sérgio Henrique Ferreira do Depto de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- Aparelho de ultracentrifugação (Amicon Corporation)
- Autoclave (FABE)
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA)
- Balança analítica mod. AL200 e Ohaus, mod. AS260D (MARTE)
- Beckers (SIMAX)
- Bastão de vidro
- Câmara de Neubauer 0.100/0.0025 mm²
- Capela de fluxo laminar, vertical (modelo VLFS-12, Veco do Brasil Ind. Com. Equip. Ltda, Campinas, SP, Brasil)

- Centrifuga Eppendorf – Mod. 5804R
- Estufa de CO₂ para cultura (Nuair TS Autoflow)
- Funis de vidro grandes
- Forno microondas
- Material cirúrgico (tesoura, pinça clínica e dente de rato)
- Membranas de ultrafiltração diaflo RYM-10 (Amicon Corporation)
- Microscópio óptico binocular (Nikon)
- Microscópio invertido (Nikon)
- Micropipetas automáticas (GILSON)
- Micrótomo
- Ponteiras para pipetas automáticas – 20, 200 ul e 1 ml (SIGMA)
- Seringas de 5 e 3 ml novas ou recicladas por autoclave
- Seringas novas de 1 ml
- Sonicador (Sonics & Materials Inc. Danbury – Connecticut – USA)
- Tubos Eppendorf -1.5 ml (GIBCO)
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX)
- Tubos plásticos de 15 ml (FALCON)
- Lâminas para microscopia Probe on plus (Fischer)

3. DROGAS, SOLUÇÕES, CITOCINAS E ANTISOROS

3.1. Drogas

- Zymosan (from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co. St Louis, USA), dissolvido em salina.
- Carragenina (FMC, Philadelphia USA)
- Talidomida (RBI, USA)
- Pentoxifilina (Sigma Chemical Co. St Louis USA)
- Clorpromazina (Sigma Chemical Co. St Louis USA)
- Indometacina (Merck, Sharp and Dohme-MSD, USA) – dissolvida em solução de bicarbonato de sódio a 5%.
- Prostaglandina E₂ (Sigma)
- Bradicinina (Sigma)
- Iloprost (ZK36374, Shering AG)
- Cloridrato de morfina (Dimorf; Laboratório Cristália-Brasil) diluída em salina.
- Cloridrato de naloxona (Narcan – Rhodia Farma) diluído em salina.
- Éter Etilico (Syth)
- Xilol (Reagen)
- Reagentes do kit Vector para imunohistquímica
- Peróxido de hidrogênio (Smith)
- Heparina (Laboratório Cristália – Brasil)
- Hidrato de Cloral (Reagen)
- avidina-peroxidase (DAKO)
- o-fenilenediamina diidrocloreto (Sigma Chemical Co., St Louis, USA)- dissolvido no tampão substrato descrito no protocolo de ELISA.
- Reagente Trizol (GibcoBRL, MD, USA)
- dNTP (Pharmacia, Uppsala, Swissa)
- Transcriptase reversa (GibcoBRL)
- First Strand Buffer (GibcoBRL)
- Taq DNA polimerase (GibcoBRL)
- DNA ladder (GibcoBRL)

3.2. Soluções

- Solução de ácido acético
Ácido Acético Glacial (Reagen), utilizado a 0.6% (v/v; concentração de 629 mg/100 ml), dissolvido em água deionizada.
- Solução de bicarbonato de sódio
Bicarbonato de sódio (Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA) utilizado a 5% (p/v) dissolvido em água destilada.
- Solução Salina 0.9% estéril (Endogen)
- Solução de H₂SO₄ a 1M.
- Albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem (Sigma)
- Soro normal de carneiro
- Solução de Turk

Ácido acético glacial (Reagen).....	20.0 ml
Violeta de genciana (Reagen).....	2.0 ml
Água destilada.....	1000.0 ml

- PBS pH 7.4
- Peróxido de Hidrogênio 3%

3.3. Tampões utilizados para o ensaio imunoenzimático

- Tampão bicarbonato pH 8.2
NaHCO₃ P.A. (Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....0,1 M
NaCl. P.A.(Merck, Sharp and Dohme – MSD, USA).....0,1 M
- Tampão Substrato pH 5.0
Ácido Cítrico.....34,7 mM
Na₂HPO₄.(Merck).....66,7 mM
- Substrato
OPD.....0,4 mg
H₂O₂.....0,4 µl
Tampão substrato q.s.p. 1 ml
- Tampão de lavagem PBS-tween 20, 0,1% v/v.

3.4. Tampões e soluções e reagentes utilizados para o ensaio de imunohistoquímica

- Tampão Citrato 0.1M pH 6.0

Citrato de sódio monohidratado.....21g
 H₂O destilada.....1L

A solução mãe (1M) foi diluída 10 vezes (concentração final 0.1M)

- Solução PBS-BSA 5%

PBS (pH 7.3).....10ml
 Albumina Bovina.....0.5mg

- Complexo ABC (Kit Vectastain®)

Reagente A (avidina DH)..... 10 µl

Reagente B (peroxidase biotinilada H).....10 µl

PBS.....1.6 ml

- Solução peróxido de hidrogênio 3%

- Solução DAB/peróxido (DAKO®)

H₂O destilada.....2.5ml

H₂O₂.....50 µl

Tris HCl pH7.0..... 50µl

DAB50µl

3.5. Meio de Cultura

- RPMI simples :

Meio RPMI 1640 Medium (Sigma, St Louis, USA; lote H0763).....10.4 g

Hepes.(Sigma Chemical Co., USA).....2.38 g

Bicarbonato de sódio (Merk, Sharp and Dohme – MSD, USA).....2.20 g

Água deionizada Milli-Q autoclavada.....1 L

- RPMI completo:

Soro fetal bovino.....10 ml

Gentamicina (Gentamicin sulfate solution; Sigma G-1522).....500 µl

Penicilina-Streptomicina (Sigma P-3539).....500 µl

Meio RPMI simples q.s.p.100 ml

O meio de cultura foi filtrado em filtro Durapore (0.22 μ mGV) com membranas estéreis (Millipore) de modo que após preparado o meio estava asséptico e apirogênico.

3.6. Citocinas e Antisoros

3.6.1. Citocinas

- Fator de Necrose Tumoral humano (TNF) 40.000 UI 1 mg/ampola.
- Interleucina 1 beta humano (IL-1 β):.) 100.000 UI 1 mg/ampola.
- Obtidos do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Inglaterra.

3.6.2. Anticorpos

- Anticorpo monoclonal IgG anti IL-4 (BVDG) e anti IL-10 (JEA.5.1.) Universidade de Glasgow, UK (Prof. F.Liew)
- Anticorpo secundário – imunohistoquímica (Anti-goat IgG H+L – Vector, BA5000)
- **Concentrações de anticorpos e proteínas para ELISA**

Murino

citocina	Ac 1^{ario}	Ac 2^{ario}	Curva (11 pontos)
TNF- α	H92/090899/JW	H92/120899/JW	2000pg/ml
IL-1 β	S5/150799/JW	S329/B4/190799/JW	2000pg/ml
IL-10	18141D	18152D	2000pg/ml
IL - 4	18181D	18042D	2000pg/ml

Rato

citocina	Ac 1^{ario}	Ac 2^{ario}	Curva (11 pontos)
TNF- α	SB230499GR	SB54/450499/GR	4000pg/ml
IL-1 β	SB1002/260499	SB1002/280499	4000pg/ml
IL-10	S142BM/0511200	S142/060300	4000pg/ml
IL-6	SB206/210499/Gr	SB206/203499/GR	4000pg/ml

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

4. TESTES NOCICEPTIVOS

4.1. Teste de contorção abdominal induzido por ácido acético ou zymosan

O modelo utilizado foi descrito anteriormente por COLLIER *et al* (1968). Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25 e 30 g. Os estímulos: ácido acético (0,6%; 0.01 ml/g de peso), zymosan (1 mg/animal; 250µl) ou iloprost (0.5 µg/animal; 250µl) foram injetados por via i.p. e a intensidade de nocicepção foi quantificada pelo número total de contorções abdominais ocorridas nos primeiros 30 min após administração do estímulo. Uma contorção foi identificada como a extensão das patas traseiras acompanhada por contração do abdômen.

4.2. Teste de incapacitação articular

O modelo foi descrito anteriormente por TONUSSI & FERREIRA (1992), posteriormente modificado (VIANA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 1999) e adaptado para o nosso laboratório. Ratos Wistar machos, pesando entre 180 a 200 g receberam a injeção intrarticular, no joelho posterior direito, de zymosan (1 mg/animal; 50 µl) e foram postos para deambular forçadamente em um carrossel de piso metálico (cilindro de alumínio, 30 cm de diâmetro x 50 cm de largura, coberto por uma tela de alumínio nas mesmas proporções), giratório, com capacidade para 3 animais. A velocidade utilizada foi de 3 RPM. As patas traseiras foram calçadas com sapatilhas metálicas, onde a sapatilha da pata direita é conectada à porta de dados de um microcomputador. Ao tocar com a sapatilha no piso metálico fecha-se um circuito e ao final de 1 min o computador registra o tempo de suspensão da pata (TSP), isto é, o tempo que o animal permaneceu com a pata levantada sem encostar-la ao piso. O TSP é medido antes da injeção do estímulo (tempo zero) e de hora em hora até a 4ª hora. Dessa forma, um aumento do TSP indica nocicepção (incapacitação articular), isto é, a incapacidade do animal deambular normalmente sobre o carrossel. Vale ressaltar, que antes da realização dos ensaios o animais foram treinados, permitindo-se um período de deambulação e adaptação ao ambiente.

4.3. Teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato

O teste hiperalgesia mecânica foi realizado de acordo com a metodologia já descrita anteriormente por FERREIRA e colaboradores em 1978. Uma pressão constante de 20mmHg é aplicada nas patas traseiras de ratos e descontinuada quando eles apresentam uma reação típica de “congelamento”. Essa reação é caracterizada por uma redução dos movimentos de escape: os animais usualmente fazem movimentos severos para escapar da posição imposta pela situação do experimento. Esses são seguidos de alterações na frequência respiratória acompanhado de um ataque de tremores. A intensidade da hiperalgesia foi quantificada como uma variação no tempo de reação (Δ tempo de reação) obtido subtraindo-se valores medidos após a administração de substâncias hiperalgésicas dos valores obtidos do tempo (controle) de reação (medidos antes da injeção no tempo zero, Ferreira *et al.*, 1978). O tempo de reação foi medido 1, 3 e 5 horas após a injeção das substâncias hiperalgésicas.

4.4. Teste da placa quente

Para testar a eficácia contra a nocicepção térmica e de ação central foi utilizado o método de EDDY & LEIMBACH (1953) com pequenas modificações. Durante o experimento foi seguido o protocolo ético (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals).

Camundongos machos, pesando entre 25 e 30 g, foram postos em uma placa quente mantida a $55 \pm 1^\circ \text{C}$ e foram retirados quando observada a reação de saltar ou lambem as patas traseiras. Foram feitas duas triagens separadas por um intervalo de 30 min, onde a primeira familiarizou o animal com o teste e serviu como uma pré-seleção (aqueles que mostraram um tempo de reação superior a 10 segundos foram descartados). A segunda serviu como o registro do tempo zero (tempo medido antes da administração das substâncias a serem testadas). Além do tempo zero os animais foram testados nos 30, 60 e 90 min após a administração das drogas. Quarenta segundos foi considerado o tempo máximo de reação para prevenir danos nas patas dos animais.

5. MÉTODOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE FLUIDOS E TECIDOS PARA ANÁLISE

5.1 Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos

Os macrófagos foram tratados e estimulados *in vivo*. Para isso, camundongos Swiss foram injetados, em grupos de 4 animais, por via ip com salina ou zymosan (1mg/animal) e após 15 minutos foram sacrificados em câmara de éter. A cavidade peritoneal foi lavada com 2 ml de meio de cultura RPMI completo em ambiente asséptico (Fluxo laminar). Colheu-se o exsudado e este foi colocado em uma placa de cultura (1 poço por animal). Foram encubadas por 12 horas em estufa de CO₂ a 37° C, numa atmosfera de 5%. Após a adesão dos macrófagos os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -70° C para posterior análise. Todo o procedimento foi cuidadosamente elaborado de forma apirogênica. Após o período de incubação foi verificada a possibilidade de contaminação por bactérias, sendo esta descartada.

5.2. Coleta do lavado articular de joelho de rato

Os animais receberam a injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 µl) no joelho posterior direito, após 3 horas foram anestesiados com éter e sacrificados por decaptação exsanguinação. A pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se a lavagem da cavidade articular pela injeção de 400 µl de salina heparinizada (40 UI/ml) através da membrana sinovial recolhendo-se o exsudato articular. As alíquotas foram colocadas em tubos ependorfs e centrifugadas. O sobrenadante foi estocado a -70°C para posterior análise.

5.3. Coleta da pele de pata de rato

Os animais receberam a injeção de carragenina (100 µg/pata; 100 µl) por via intraplantar seguindo o mesmo protocolo adotado para a indução de hiperalgesia no modelo de hiperalgesia mecânica em pata de rato. Duas horas após a indução do estímulo os animais foram sacrificados e foi feita a remoção das peles com bisturi. As peles foram fixadas em solução formol 10% durante

12 horas. Após a fixação o tecido foi desidratado e incluído em parafina para a realização de cortes histológicos para posterior ensaio imunohistoquímico.

6. DOSAGEM E IMUNOHISTOQUIMICA PARA A DETECÇÃO DE CITOCINAS

6.1. Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos e em sobrenadante do lavado articular de joelho de rato

O sobrenadante estocado foi descongelado para a quantificação de citocinas como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4 e CINC-1. O material foi dosado pelo protocolo de ELISA descrito a seguir:

- Incubação com 2 μ g/ml de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2) - 100 μ l/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4° C.
- Lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v.
- Bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 2h à temperatura ambiente.
- Lavagem da placa (3x)
- Incubação com a curva padrão das citocinas diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ l/poço por 16-24h à 4° C).
- Lavagem da placa (3x)
- Incubação com anticorpo biotilado diluído a 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente
- Lavagem da placa (3x)
- Incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 15 min à temperatura ambiente.
- Lavagem da placa (3x)
- Incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μ l/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente.
- A reação foi parada com 150 μ l/poço de H₂SO₄ 1M.
- A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm.

- Os resultados são expressos em ug/ml como a curva padrão.

6.2. Imunohistoquímica em pele de pata de rato para a detecção de TNF.

As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. O ensaio imunohistoquímico foi realizado seguindo o protocolo a seguir:

- Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6.0) e aquecidas a ~100oC durante 15 min.
- Resfriamento em temperatura ambiente durante 20 min
- Lavagem em PBS (5 min)
- Bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 3% durante 15 min
- Lavagem com PBS
- Diluição do anticorpo primário em PBS – BSA 5% (vide reagentes e soluções)
- Incubação com anticorpo primário anti-TNF de rato (Vector)- overnight
- Lavagem com PBS
- Diluição do anticorpo secundário (Anti-goat IgG H+L – Vector, BA5000) em PBS-BSA 5%
- Incubação com anticorpo secundário (30 min)
- Preparo do complexo ABC (vide reagentes e soluções)
- Lavagem das peças em PBS
- Incubação com o complexo ABC
- Lavagem com PBS
- Incubação com DAB/peróxido (2 min)
- Lavagem com H₂O destilada
- Contra-coloração com hematoxilina de Harry's
- Desidratação e montagem das lâminas

6.3. Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR)

As células peritoneais foram coletadas de camundongos previamente (30 min) estimulados com zymosan (1 mg/animal). As células serão submetidas

ao protocolo de RT-PCR para a determinação dos níveis de RNAm para TNF descrito a seguir:

- Contagem das células em contador automático (COULTER A^oT, Miami, USA).
- Homogeneização de 0.5 milhões de células em 1.0 ml de reagente Trizol.
- Adição de 0.2 ml de clorofórmio às amostras e agitação vigorosa por 30s
- Centrifugação das amostras a 4°C por 15 min (13,000 X g)
- A fase aquosa é transferida para um tubo novo onde foi adicionado um volume equivalente de isopropanol e posterior mistura
- Incubação por 15 min a -20°C
- Centrifugação a 4°C por 15 min (13,000 X g) para precipitação do RNA
- O RNA precipitado foi lavado com 0.5 ml de etanol
- Suspensão da preparação com 50 µl de água dietilpirocarbonada contendo EDTA 1µM
- Transcrição reversa com a incubação de 10 µl do RNA com dNTP, 200 U do superscript da transcriptase reversa, tampão Strand, e água dietilpirocarbonada (DEPC-H₂O) por 1 hora 37°C
- A reação foi parada aquecendo-se a 90°C por 5 min e resfriamento a 4°C por 5 min.
- A amplificação da cadeia de polimerase utilizou os primers para o TNFm (Fwd -GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG; Rvs-CTCCAGCTGGAAGACTCCTC-CCAG) e β-actina (Fwd -TGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC; Rvs -TAA-AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG) sendo realizado na presença da Taq DNA polimerase, tampão PCR, MgCl₂ (1.5 mM), a mistura dNTP e água estéril.
- O PCR é conduzido em sistema Perkin-Elmer Cetus GeneAmp 9600 começando com uma incubação de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 s, anelando a 65°C por 60s e extensão a 72°C por 2 min. A extensão final é feita a 72°C por 7 min.

7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

7.1. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, zymosan ou iloprost.

Talidomida (5 – 45 mg/kg), pentoxifilina (0.5 – 45 mg/kg) ou clorpromazina (0.1 - 1 mg/kg) foram injetadas num volume de 0.3 ml/ 30 g de peso do animal por via i.p. 30 min antes da injeção também i.p. do estímulo ácido acético (0.6%), zymosan (1 mg/animal) ou iloprost (0.5 ug/animal). As contorções abdominais foram computadas durante 30 min após a administração dos mesmos (ilustração 2.1).

7.2. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a incapacitação articular induzida por zymosan.

Talidomida (5 –45 mg/kg), pentoxifilina (0.5 – 45 mg/kg) ou clorpromazina (0.1 a 1 mg/kg) foram injetadas num volume de 500 µl/200g de peso do animal por via i.p. 30 min antes da injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 µl). O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos de hora em hora até a 4ª hora após a injeção do estímulo (ilustração 2.2.).

7.3. Efeito do pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a hiperalgesia mecânica em pata de rato induzida por diversos estímulos.

Talidomida (5 –45 mg/kg; i.p.), pentoxifilina (0.5 – 100 mg/kg; i.p. ou 1 – 9mg/pata; i.pl.) ou clorpromazina (0.1 a 1 mg/kg; i.p. ou 0.02 – 0.2mg/pata; i.pl.) foram injetadas 30 min antes do estímulo: carragenina (100 ug/pata), bradicinina (500 ng;pata), TNF (2.5 pg/pata), IL-1 (1 pg/pata) ou PGE₂ (100ng/pata). A intensidade de hiperalgesia foi medida como citado anteriormente (ilustração 2.3).

7.4. Efeito do pré-tratamento com os anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 na atividade de talidomida na hiperalgesia induzida por carragenina. Ratos foram injetados com 50 µg de anticorpo anti IL-4 ou anti IL-10, ou com um soro controle, 50 µl, via i.p. 30 min depois foi administrado salina ou talidomida (45mg/kg; i.p.). Interleucina-4 (IL-4; 10 ng/50 µl) ou interleucina-10 (IL-10, 100ng/50 µl) foram administradas na mesma pata que recebeu os anticorpos correspondentes. Após 30 min Carragenina (100 µg/pata; 100 µl) foi injetada e a intensidade de hiperalgesia foi mensurada 3 horas após como descrito acima.

7.5. Efeito da talidomida e pentoxifilina no teste da placa quente.

Após a tomada do tempo zero, talidomida (45 mg/kg), pentoxifilina (1.6 mg/kg), clorpromazina (1 mg/kg), morfina (5 mg/kg) ou indometacina (2 mg/kg) foram injetadas por via i.p. e 30, 60 e 90 min depois foi registrado o tempo de reação (s) na placa quente (55 + 1° C) ver ilustração 2.4.

7.6. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina ou da clorpromazina.

Camundongos Swiss foram previamente tratados (30 min; i.p.) com salina (300 µl), talidomida (45 mg/kg), pentoxifilina (1,6 mg/kg), clorpromazina (1 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg; 15 min antes). Salina ou naloxona (2 mg/kg) por via s.c. foi administrada 15 min antes dos tratamentos. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via i.p. e logo em seguida as contorções abdominais foram computadas durante 30 min.

7.7. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina na liberação de diversas citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vivo* por zymosan.

Os camundongos foram pré-tratados com talidomida (45 mg/kg), pentoxifilina (0.5 – 45 mg/kg) ou clorpromazina (1 mg/kg) antes da injeção i.p. de zymosan (1 mg/animal). 15 min depois, os animais foram sacrificados e o exudato peritoneal foi colhido e posto em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi retirado para a realização da dosagem de TNF, IL-1 β , IL-10, IL-4 e IL-6 pelo protocolo de ELISA descrito anteriormente (ilustração 2.5).

7.8. Efeito da talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre os níveis de citocinas presentes no lavado articular do joelho de ratos submetidos á artrite experimental por zymosan.

Talidomida (45 mg/kg), pentoxifilina (1.6 mg/kg) ou clorpromazina (1 mg/kg) foi injetada por via i.p. 30 min antes da injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 μ l). A lavagem da cavidade articular para a coleta do exudato foi feita 2 horas após a injeção do estímulo. O exudato foi centrifugado e o sobrenadante estocado para posterior análise (ilustração 2.6).

7.9. Efeito do pré-tratamento com talidomida, pentoxifilina ou clorpromazina sobre a detecção de TNF por imunohistoquímica em pele de rato estimulada com carragenina.

Os animais foram pré-tratados com talidomida (45 mg/kg; i.p.), pentoxifilina (9mg/pata; i.pl.) ou clorpromazina (1mg/kg; i.p.) 30 min antes da injeção i.pl. de carragenina (100 ug/pata; 100 ul). Após 2h da injeção do estímulo as peles foram removidas para a realização de imunohistoquímica de acordo com o protocolo supracitado (ilustração 2.7).

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Turkey. O número (N) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. A significância mínima foi aceita ao nível de $P < 0.05$.

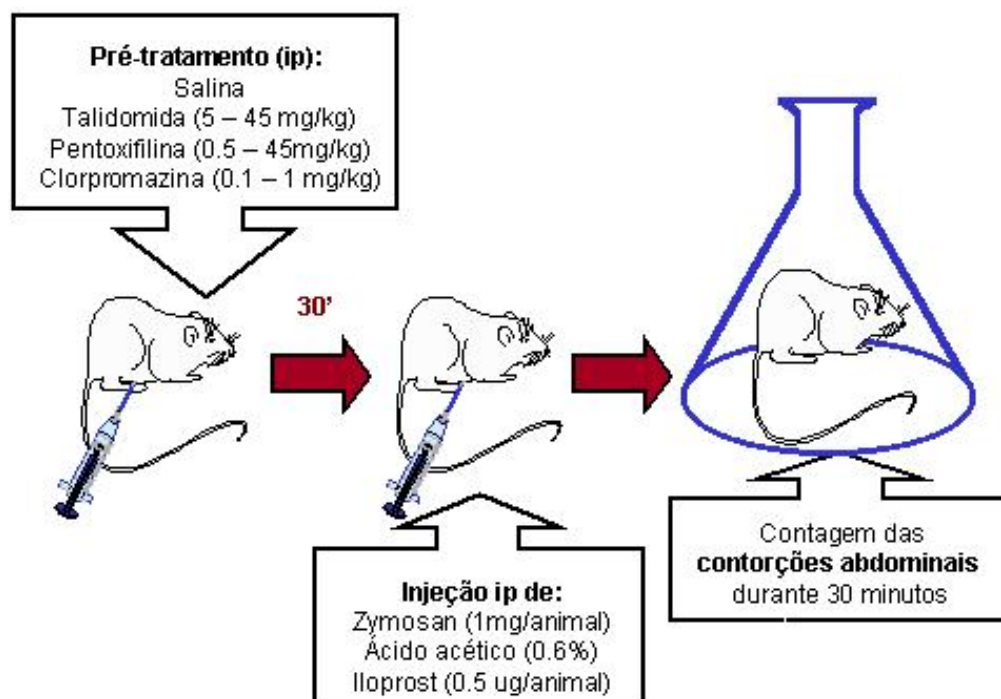


Ilustração 2.1. Teste de contorção abdominal em camundongos induzido por zymosan, ácido acético ou iloprost

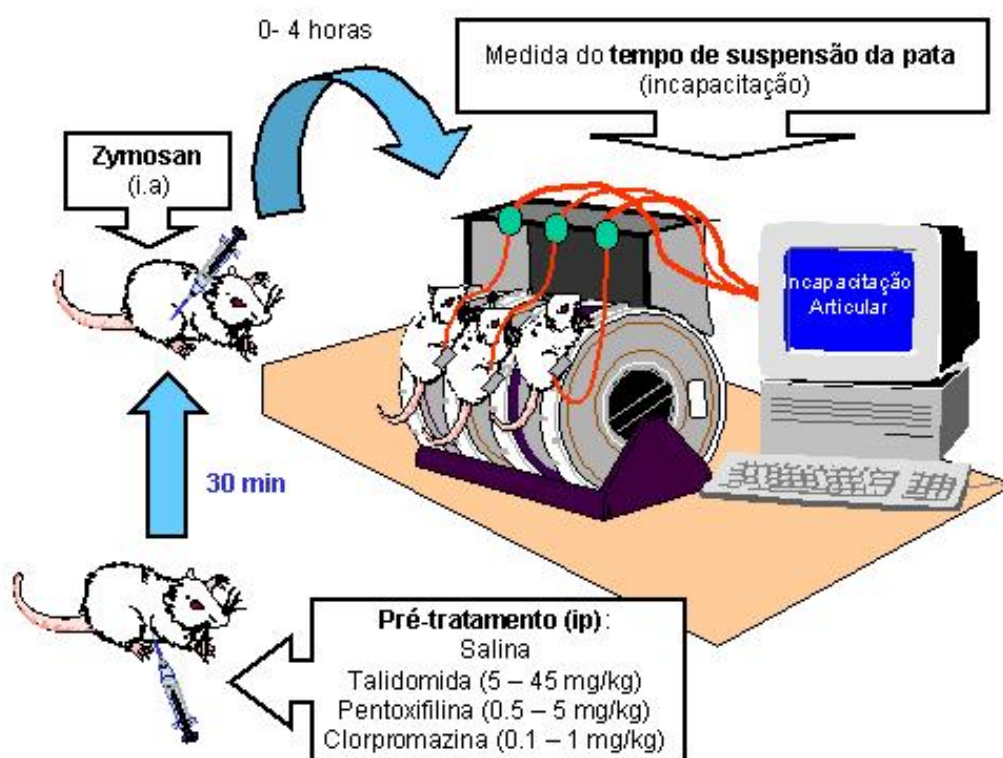


Ilustração 2.2. Teste de incapacitação articular em joelho de rato induzido por zymosan

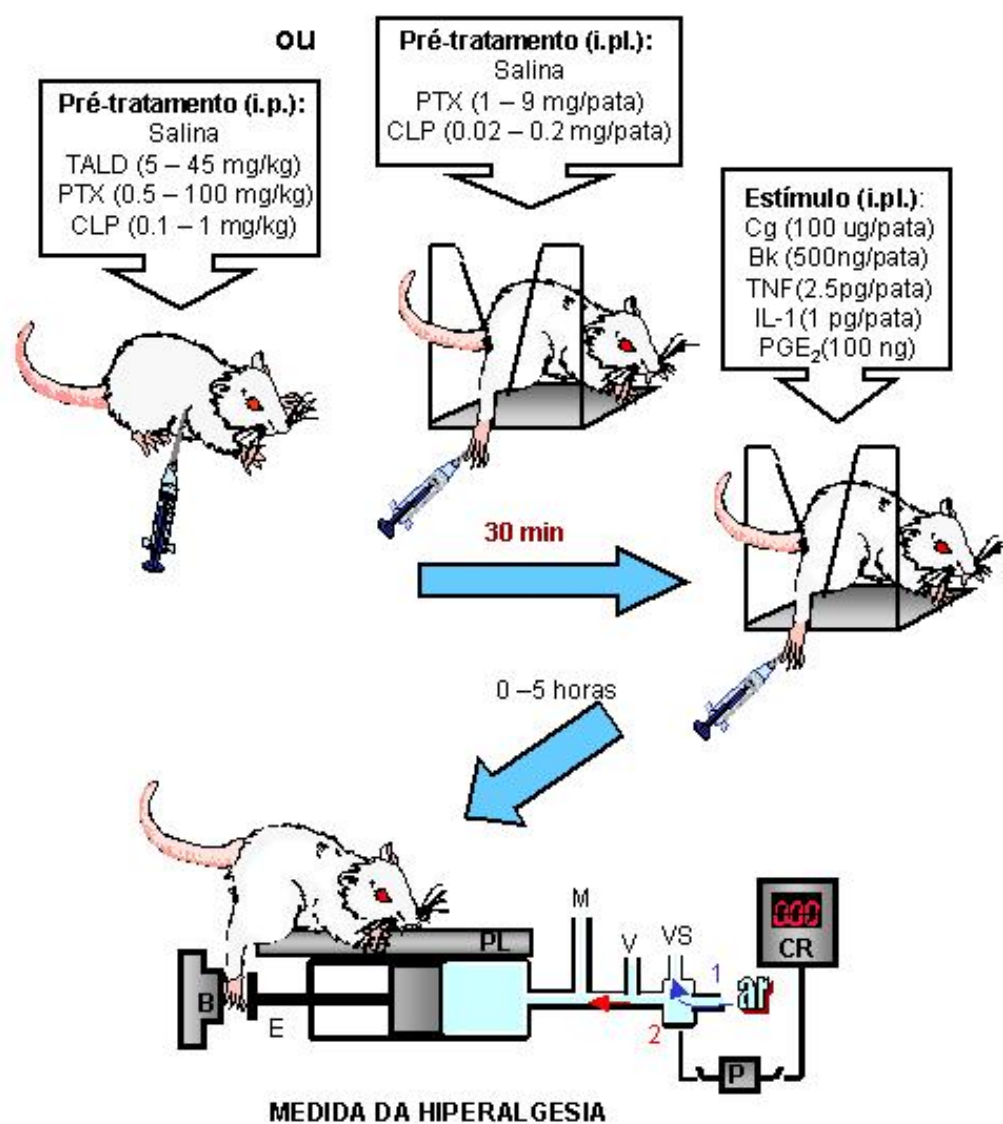


Ilustração 2.3. Teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-Selitto modificado por Ferreira e Cols., 1978) induzida por diversos estímulos.

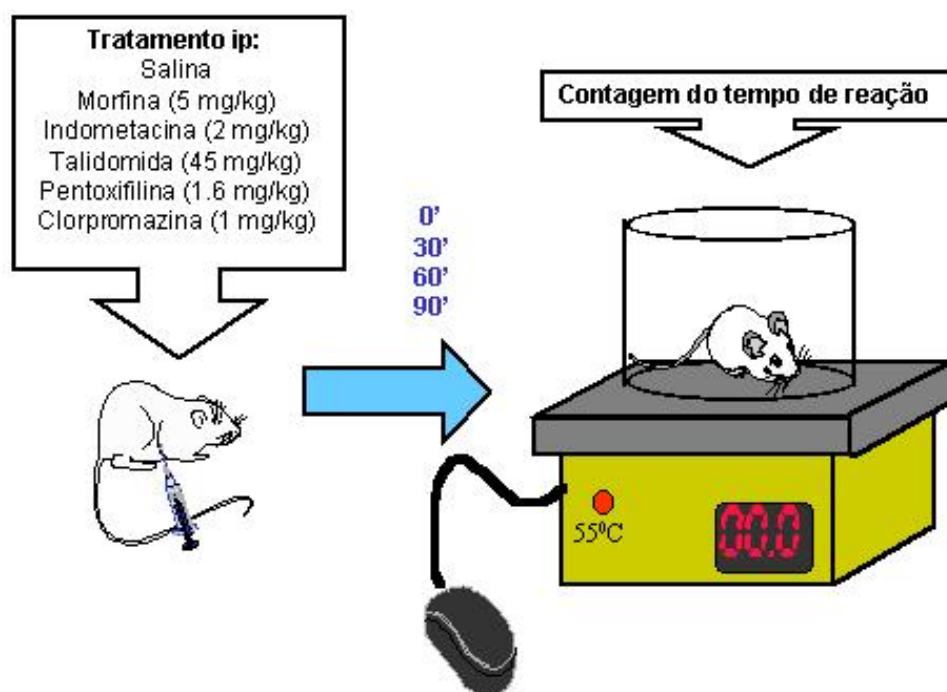


Ilustração 2.4. Teste da placa quente em camundongos

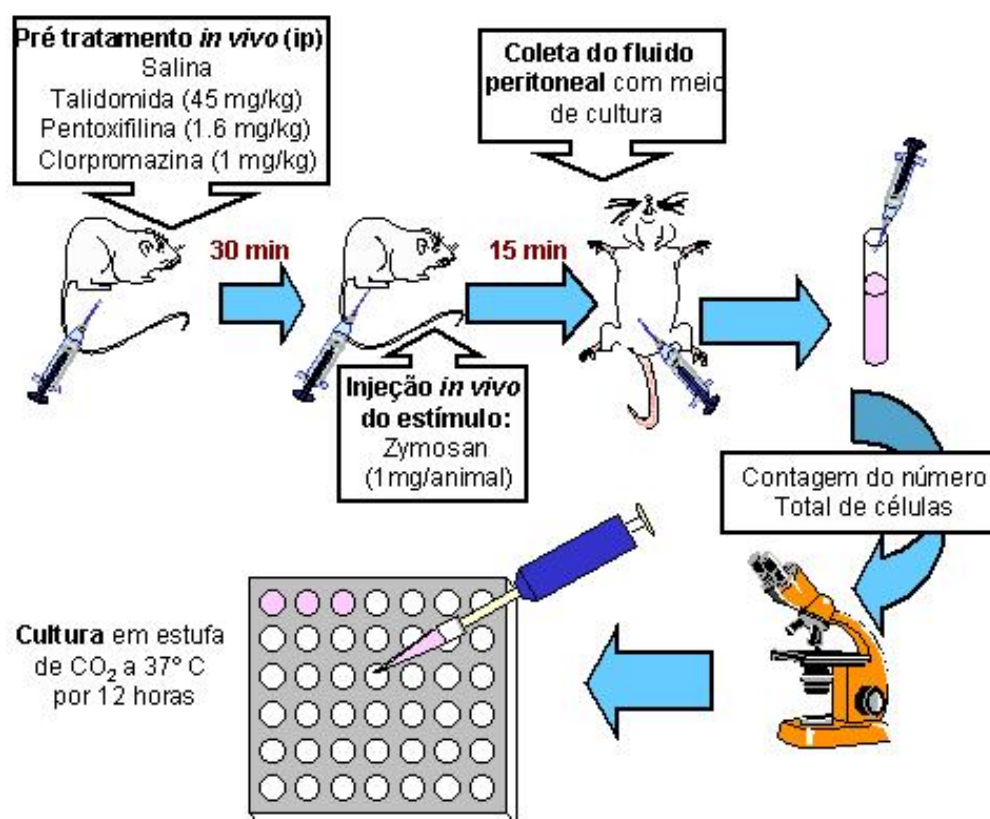


Ilustração 2.5. Obtenção do sobrenadante de cultura de células peritoneais estimuladas *in vivo* com zymosan

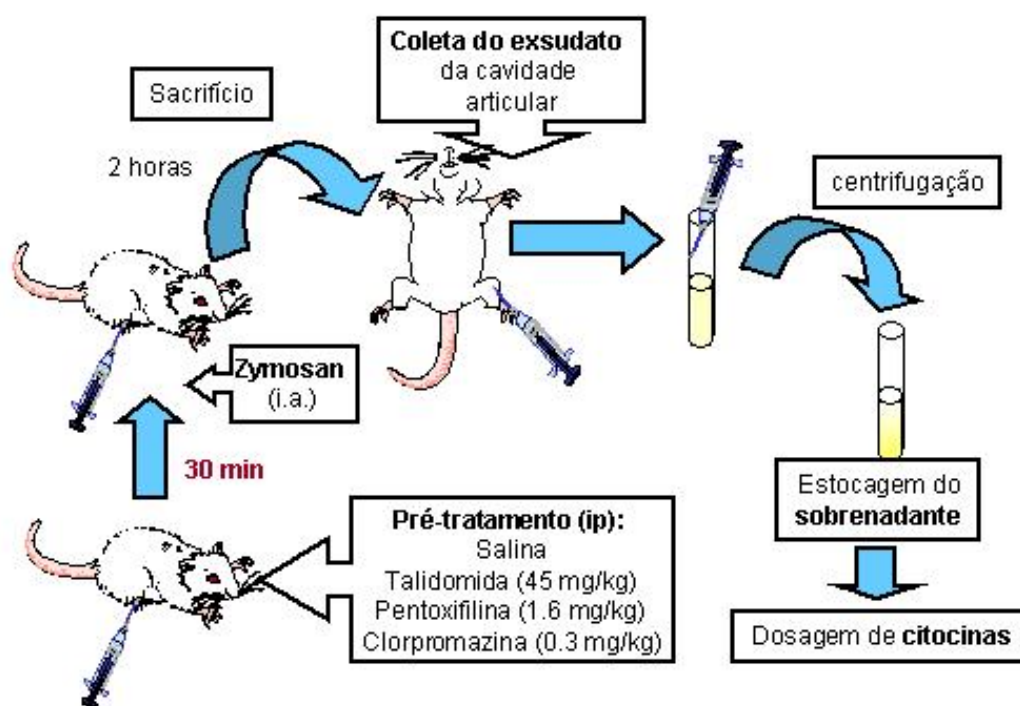


Ilustração 2.6. Obtenção do sobrenadante do lavado articular da cavidade articular de joelho ratos estimulados com zymosan.

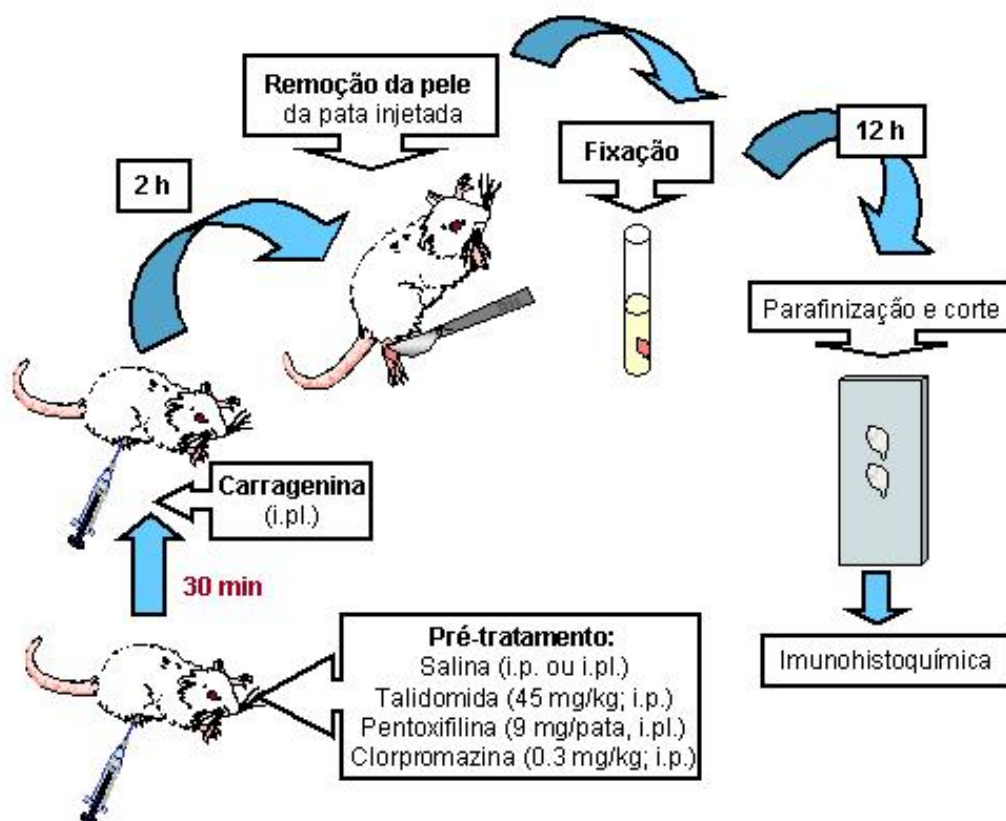


Ilustração 2.7. Obtenção de peças histológicas para realização do ensaio de imunohistoquímica.

III. RESULTADOS

1. Inibição da atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético por talidomida no modelo de contorções abdominais.

A injeção intraperitoneal de talidomida nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, 30 min antes do estímulo nociceptivo, foi capaz de reduzir de forma dose-dependente as contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal, i.p.; Figura 1A) ou ácido acético (0.6%, i.p.; Figura 1B). O bloqueio foi significativo nas três doses quando o estímulo era zymosan com 33.9%, 51.7% e 85.6% ($p < 0.001$, na resposta máxima) de inibição respectivamente para as doses de 5, 15 e 45 mg/kg e 40.4% e 60.3% ($p < 0.001$, na resposta máxima) de inibição respectivamente para as doses de 5 e 45, quando o estímulo utilizado foi o ácido acético.

2. Efeito do pré-tratamento com talidomida sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular em joelho de rato.

Talidomida foi administrada por via i.p. nas doses de 1, 5 e 45 mg/kg, 30 min antes da injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 μ l). Na Figura 2 a cinética mostra que o pico de incapacitação ocorreu na 4^a hora e que talidomida inibiu a incapacitação articular (Δ tempo de suspensão da pata), de modo significativo, na 3^a hora (89%, $p < 0.05$, dose de 45mg/kg) e na 4^a hora (71,4% e 70%, $p < 0.05$, respectivamente para as doses de 15 e 45 mg/kg).

3. Efeito antinociceptivo da talidomida sobre a intensidade de hiperalgia induzida por carragenina.

Talidomida nas doses de 5 a 45 mg/kg foi administrada por via i.p., 30 min antes ou 1 hora depois da injeção intraplantar de carragenina (100 μ g/pata) Foi observado que talidomida nas doses de 5 e 45 mg/kg inibe de forma significativa a hiperalgia induzida por carragenina em até 72% na 2^a hora, 78% na 3^a hora e 76.8% na 4^a hora ($p < 0.001$) na dose de 45 mg/kg (figura 3, painel A) quando injetada previamente á carragenina mas não quando injetada após o estímulo (Figura 5). Nas mesmas doses em que inibe a hiperalgia talidomida não inibe o edema de pata induzido por carragenina (figura 4). O painel B da figura 3 mostra a inibição dose-dependente observada na 3^a hora (pico de hiperlgesia).

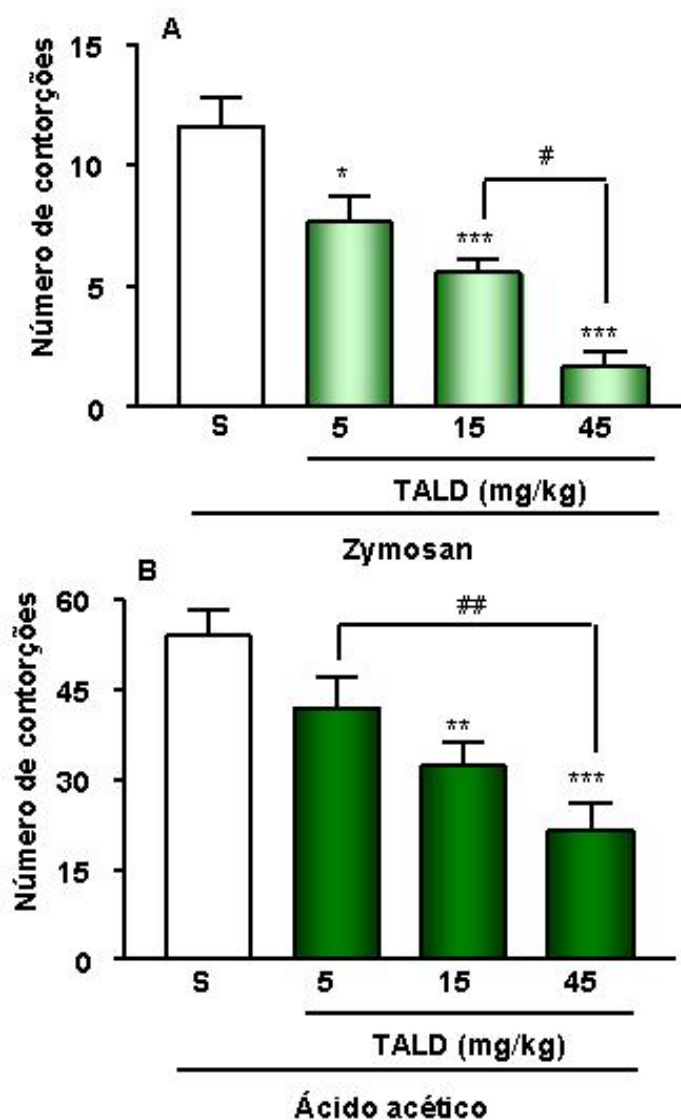


FIGURA 1. Efeito antinociceptivo da talidomida nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan. Zymosan (1 mg/animal; Painel A) ou Ácido acético (0.6%; Painel B) foi administrado por via i.p. em camundongos Swiss previamente tratados (30 min antes; i.p.) com salina (controle - S) ou talidomida (5 - 45 mg/kg; TALD). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva em grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$; Turkey - ANOVA) e os sustentados indicam diferença estatística entre os grupos pré-tratados com TALD (# $p < 0.05$ e ## $p < 0.01$; Turkey - ANOVA).

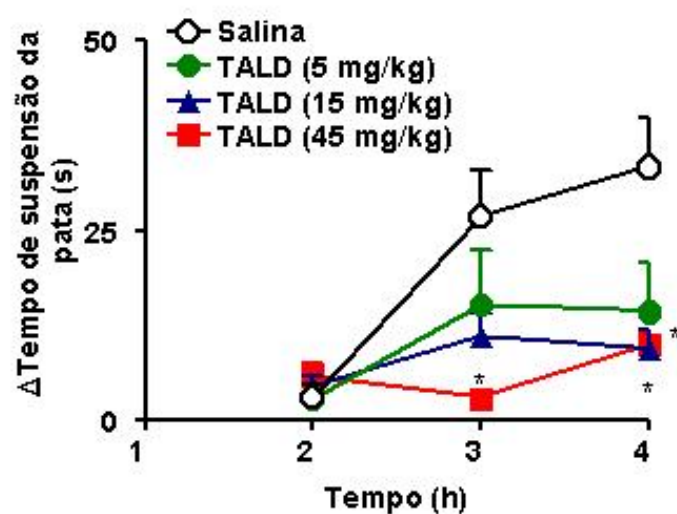


FIGURA 2 . Efeito antinociceptivo da talidomida sobre a incapacitação articular induzida por zymosan. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos previamente tratados por via i.p. com salina (controle, S) ou talidomida (5 - 45 mg/kg; TALD). Durante 60 segundos, a cada 1 hora, foi analisado o tempo de suspensão da pata do animal. Os pontos representam a média \pm EPM do tempo de suspensão da pata, de grupos de 6 animais. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$; Turkey – ANOVA).

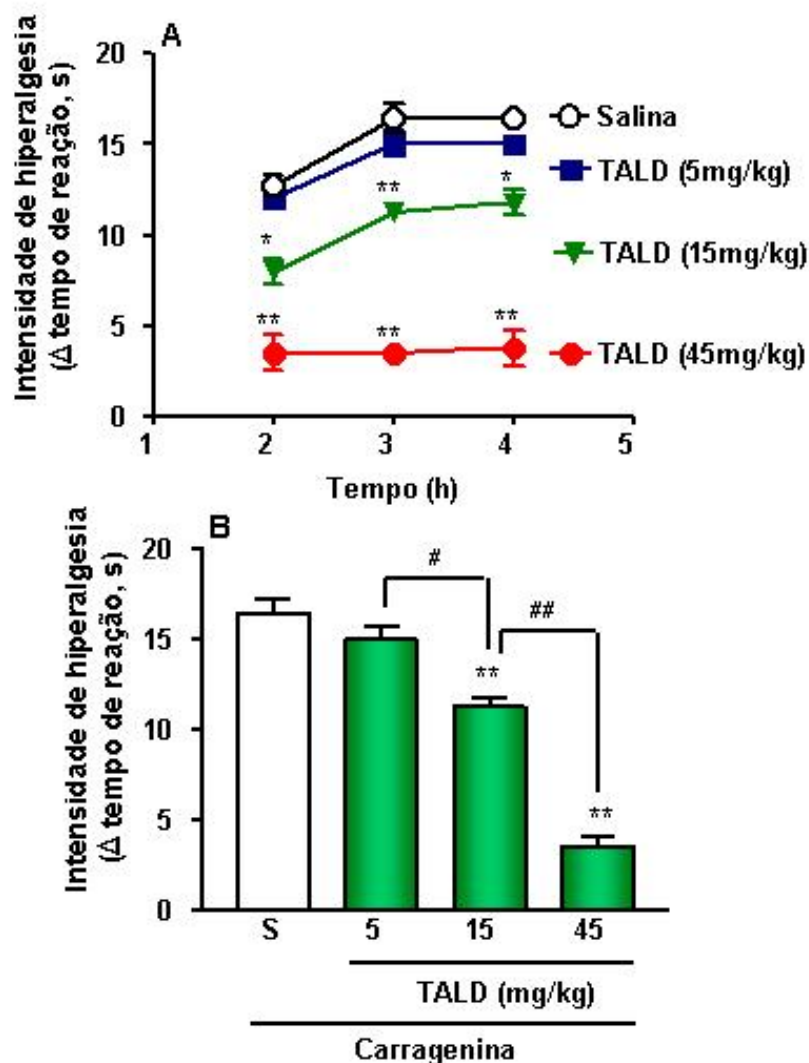


FIGURA 3. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Carragenina ($100 \mu\text{g/pata}$) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, S) ou talidomida (5 – 45 mg/kg, TALD) por via i.p. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica de hora em hora até a 4ª hora. Os pontos (painel A) representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) em função do tempo em horas. O Painel B representa a média \pm EPM do Δ tempo de reação realizado na 3ª hora após a injeção do estímulo (pico de hiperalgesia), de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.01$ e ** $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e os sustenidos indicam diferença estatística entre os grupos pré-tratados com TALD (# $p < 0.01$ e ## $p < 0.001$; Turkey - ANOVA).

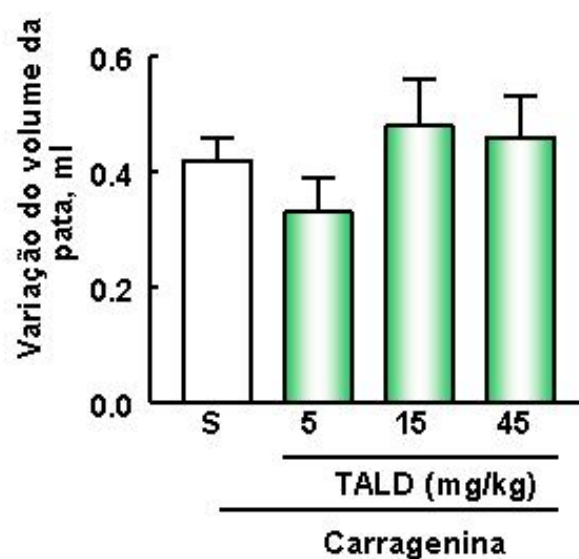


FIGURA 4. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a intensidade de edema induzido por carragenina. Carragenina (100 μ g/pata) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, S) ou talidomida (5 – 45 mg/kg, TALD) por via i.p. A variação do volume da pata foi medido antes (tempo zero) e 3 horas após a administração da substância hiperalgésica. As barras representam a média \pm EPM da variação do volume da pata em ml.

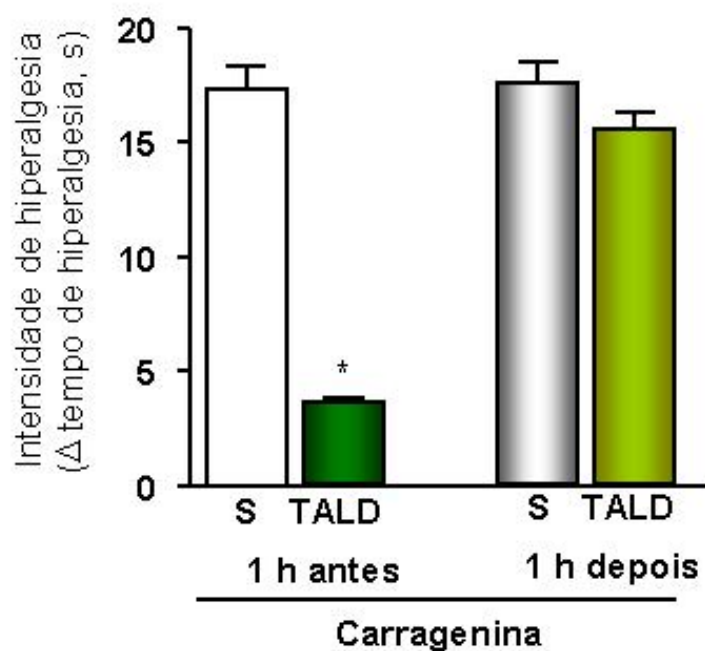


FIGURA 5. Efeito do pós-tratamento com talidomida sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Talidomida (45 mg/kg; TALD) foi administrada i.p. antes (1 h) ou depois (1 h) da injeção da substância hiperalgésica carragenina (100 μg/pata; intraplantar). Os controles (S) receberam salina, i.p., 1 h antes ou 1 h depois da injeção da substância hiperalgésica. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e 3 h após administração da substância hiperalgésica (pico de hiperalgesia). As barras representam a média ± EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) de grupos de 5 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* p<0.001; Turkey – ANOVA).

4. Efeito da talidomida sobre a intensidade de hiperalgisia induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF) ou prostaglandina E₂ (PGE₂).

O pré-tratamento com talidomida (45 mg/kg) por via i.p., 30 min antes do estímulo bradicinina (500 ng/pata) inibiu, de forma significativa, a intensidade de hiperalgisia (Δ tempo de reação) em 82,4% ($p < 0.001$). No entanto talidomida na mesma dose não inibiu a hiperalgisia induzida por TNF (2.5 pg/pata) ou PGE₂ (100 ng/pata) quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com salina (figura 6).

5. Efeito dos anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 no efeito anti-hiperalgésico da talidomida. O anticorpo anti IL-4 (50 μ g) ou anti IL-10 (50 μ g) quando administrados por via intraplantar não alteraram a atividade anti-hiperalgésica da talidomida (45mg/kg; i.p.; figura 7 painel A) quando comparado com o grupo que recebeu talidomida e soro controle. No entanto as mesmas quantidades dos respectivos anticorpos foram capazes de reverter a atividade inibitória de Interleucina-4 (IL-4; 10 ng/50 μ l) ou interleucina-10 (IL-10, 100ng/50 μ l) quando administradas na mesma pata que receberam os anticorpos correspondentes (figura 7, painel B).

6. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela injeção prévia de talidomida nas contorções abdominais induzidas por zymosan.

Naloxona (2 mg/kg,; s.c.) quando injetada antes da administração de talidomida (45 mg/kg, i.p.; dose de maior efeito) não foi capaz de reverter o bloqueio por talidomida das contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal; i.p.) quando comparada ao grupo pré-tratado somente com talidomida na mesma dose. No entanto a mesma dose de naloxona foi capaz de reverter completamente o bloqueio das contorções abdominais por morfina (5mg/kg), quando este grupo é comparado ao grupo pré-tratado somente com morfina (Figura 8).

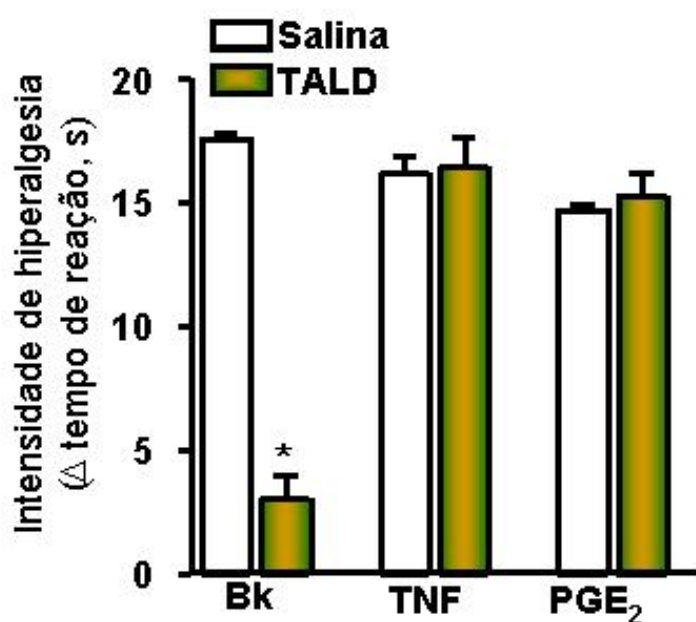


FIGURA 6. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral, ou prostaglandina E_2 . Bradicnina (500ng/pata; Bk), fator de necrose tumoral (2.5 pg/pata; TNF), ou prostaglandina E_2 (100 ng/pata; PGE₂) foram administrado por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle - S) ou talidomida (45 mg/kg) por via i.p. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica. As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) realizado na 3ª hora após a injeção da substância hiperalgésica (pico de hiperalgesia), em grupos de 5 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.001$; Turkey – ANOVA).

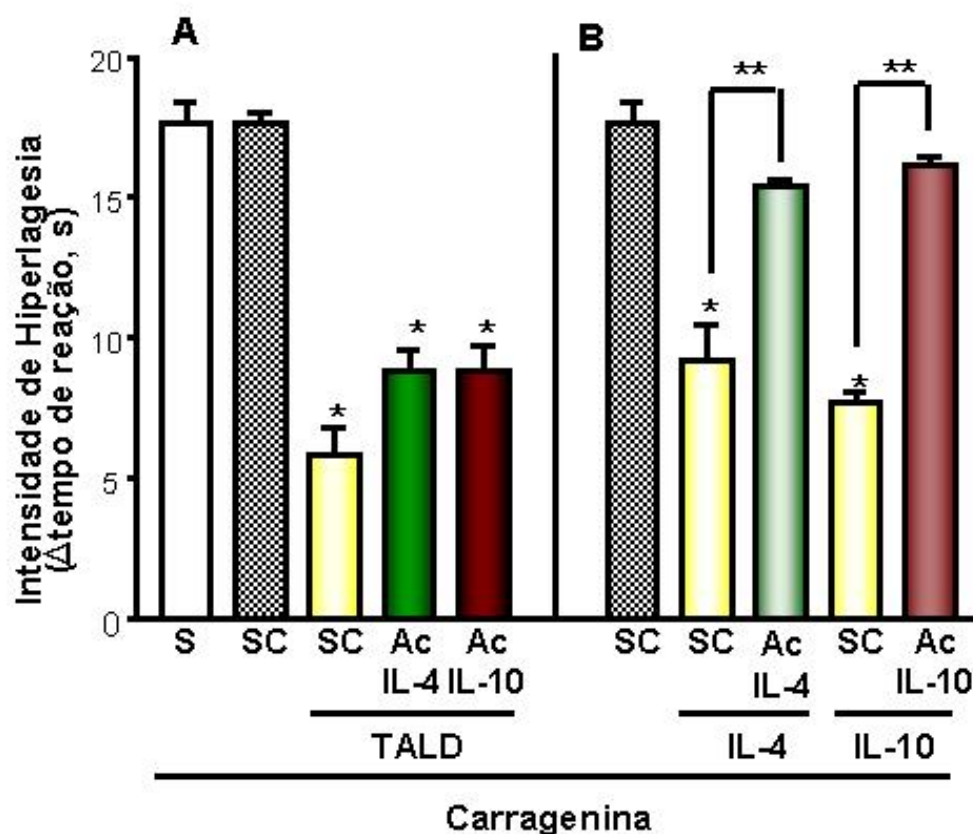


FIGURA 7. Efeito dos anticorpos anti-interleucina-4 ou anti-interleucina-10 no efeito anti-hiperalgésico da talidomida. Ratos foram injetados com 50 μ g de anticorpo anti IL-4 (AcIL-4) ou anti IL-10 (AcIL-10), ou com um soro controle (SC), 50 μ l, via i.p. 30 min depois foi administrado salina (S) ou talidomida (TALD; 45mg/kg; i.p.; painel A). Interleucina-4 (IL-4; 10 ng/50 μ l) ou interleucina-10 (IL-10; 100ng/50 μ l) foram administradas na mesma pata que receberam os anticorpos correspondentes (painel B). Após 30 min Carragenina (100 μ g/pata; 100 μ l) foi injetada e a intensidade de hiperlagesia foi mensurada 3 horas após. Os resultados são expressos com média+ EPM de grupos de 5 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação aos respectivos controles (* $p < 0.001$ ** $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

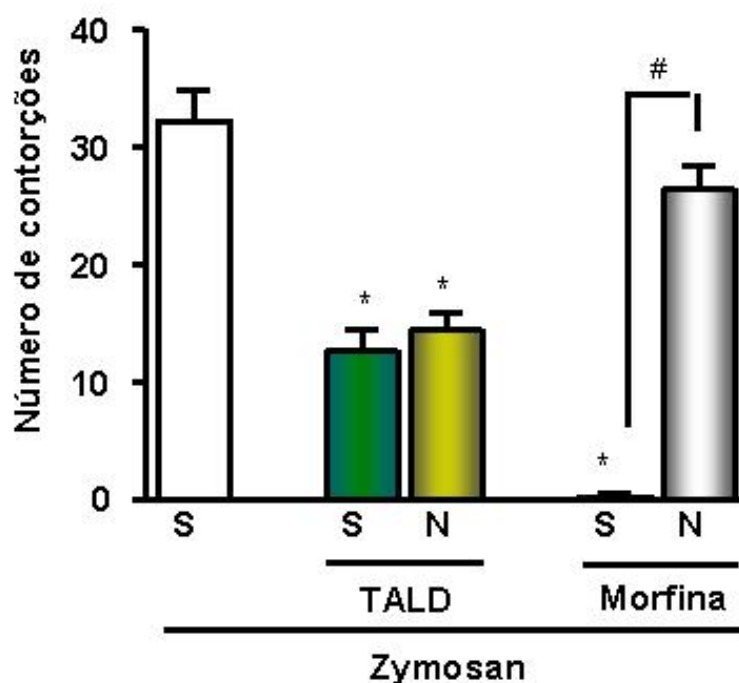


FIGURA 8. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da talidomida nas contorções abdominais induzidas por zymosan. Talidomida (45 mg/kg; TALD) foi administrada por via i.p. em camundongos Swiss pré-tratados 15 min antes com salina (S) ou naloxona (2 mg/kg; N) por via s.c. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via i.p. 30 min após a talidomida. Um experimento controle foi feito para certificar a eficácia da naloxona onde salina (S) ou naloxona (2mg/kg; N) foram administradas s.c. 15 min antes da morfina (5 mg/kg) e após 15 min foi administrado o estímulo (zymosan). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções abdominais ocorridas após 30 min da injeção da substância hiperalgésica em grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu somente salina (S) como pré-tratamento (* p <0.001; Turkey – ANOVA) e os sustentados indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu morfina (# p <0.001; Turkey – ANOVA).

7. Efeito da talidomida sobre o tempo de reação no teste da placa quente.

Talidomida (45mg/kg; doses de maior efeito no teste de contorção abdominal), a exemplo do observado com a indometacina ou salina, quando dada por via i.p., não foi capaz de modificar o tempo de reação dos animais no teste da placa quente (Figura 9). Efeito este diferente da morfina (5 mg/kg; ip) que foi capaz de aumentar esse tempo em até 100% ($p < 0,001$; maior efeito).

8. Efeito da talidomida na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados *in vivo* com zymosan.

Talidomida na dose que induziu o maior efeito inibitório sobre as contorções abdominais (45 mg/kg) foi capaz de inibir em 100% ($p < 0.001$) a liberação de TNF (Figura 10, painel A) mas não a liberação de IL-1 β ou IL-10 (Figura 10, painel B e C) por macrófagos peritoneais quando injetada *in vivo* 30 min antes do estímulo zymosan, na mesma dose capaz de induzir contorções abdominais (1 mg/animal). A inibição da liberação de TNF por talidomida foi constatada pela dosagem das mesmas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos obtidos das cavidades previamente tratadas com talidomida e estimuladas com zymosan. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para as citocinas como descrito anteriormente.

9. Efeito da talidomida na liberação de citocinas para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan

Talidomida na dose que induziu o maior efeito no bloqueio da incapacitação articular (45 mg/kg) foi capaz de inibir em 77% ($p < 0.001$) a liberação de TNF (Figura 11, painel A) mas não a liberação de IL-1 β , IL-10, IL-6 ou CINC-1 (Figura 11, painel B, C, D e E) para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan na mesma dose capaz de induzir incapacitação articular (1 mg/cavidade). A inibição da liberação de TNF por talidomida foi constatada pela dosagem da mesma no sobrenadante do fluido coletado através da lavagem da cavidade articular de juntas estimuladas com zymosan. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para as citocinas como descrito anteriormente.

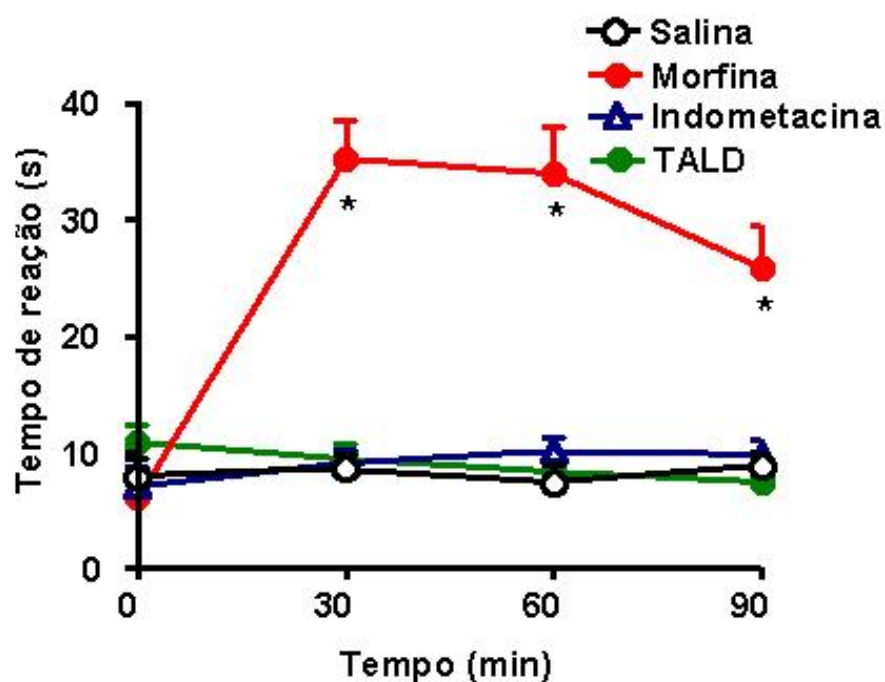


FIGURA 9. Efeito da talidomida sobre o tempo de reação no teste da placa quente. Salina, morfina (5 mg/kg), indometacina (2 mg/kg) ou talidomida (45 mg/kg; TALD) foram administradas por via i.p. imediatamente após a medição do tempo zero. O tempo de reação foi medido em intervalos de 30 min até os 90min. Os pontos representam a média ± EPM do tempo de reação em segundos de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina (*p<0.001; Turkey – ANOVA).

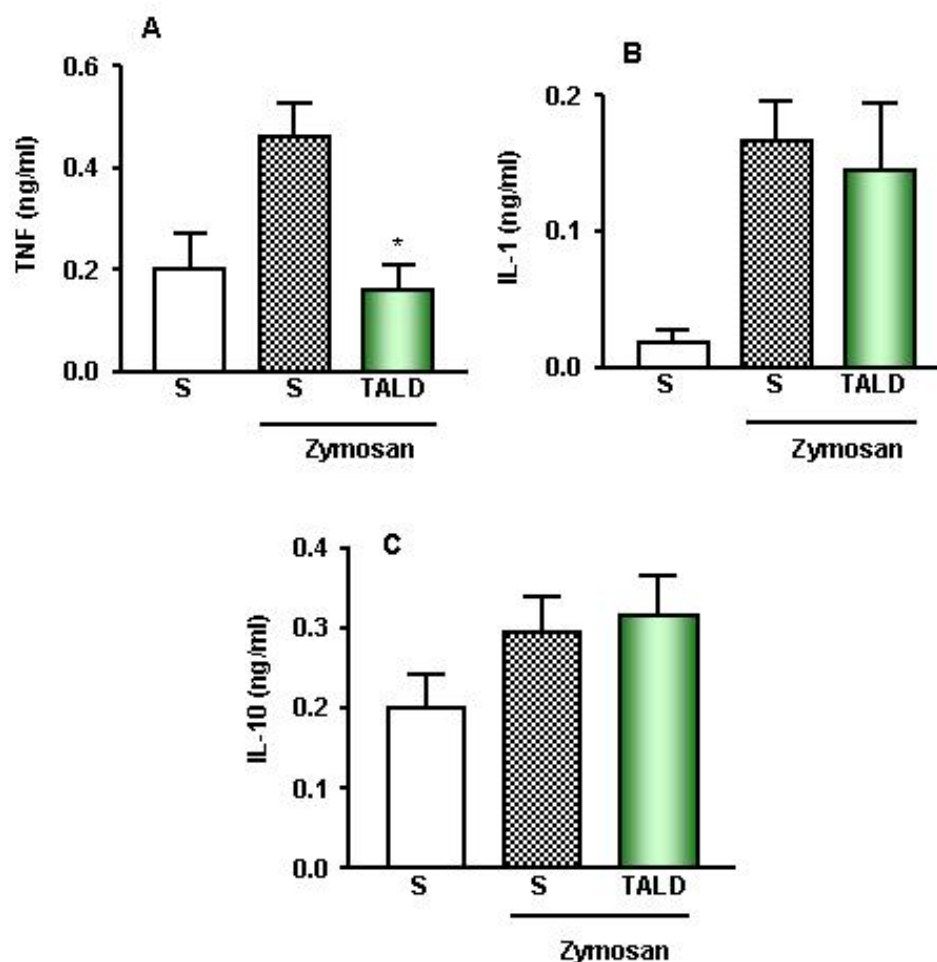


FIGURA 10. Efeito da talidomida na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas *in vivo* com zymosan. Zymosan (1 mg/kg) foi administrado em camundongos Swiss previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou talidomida (45 mg/kg; TALD). Quinze minutos após a injeção do zymosan as células peritoneais foram colhidas e postos em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi colhido e TNF (painel A), IL-1 β (painel B) ou IL-10 (painel C) foram dosados por espectrofotometria (ELISA). As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada TNF, IL-1 β ou IL-10 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina (S) como pré-tratamento (* p <0.05; Turkey – ANOVA).

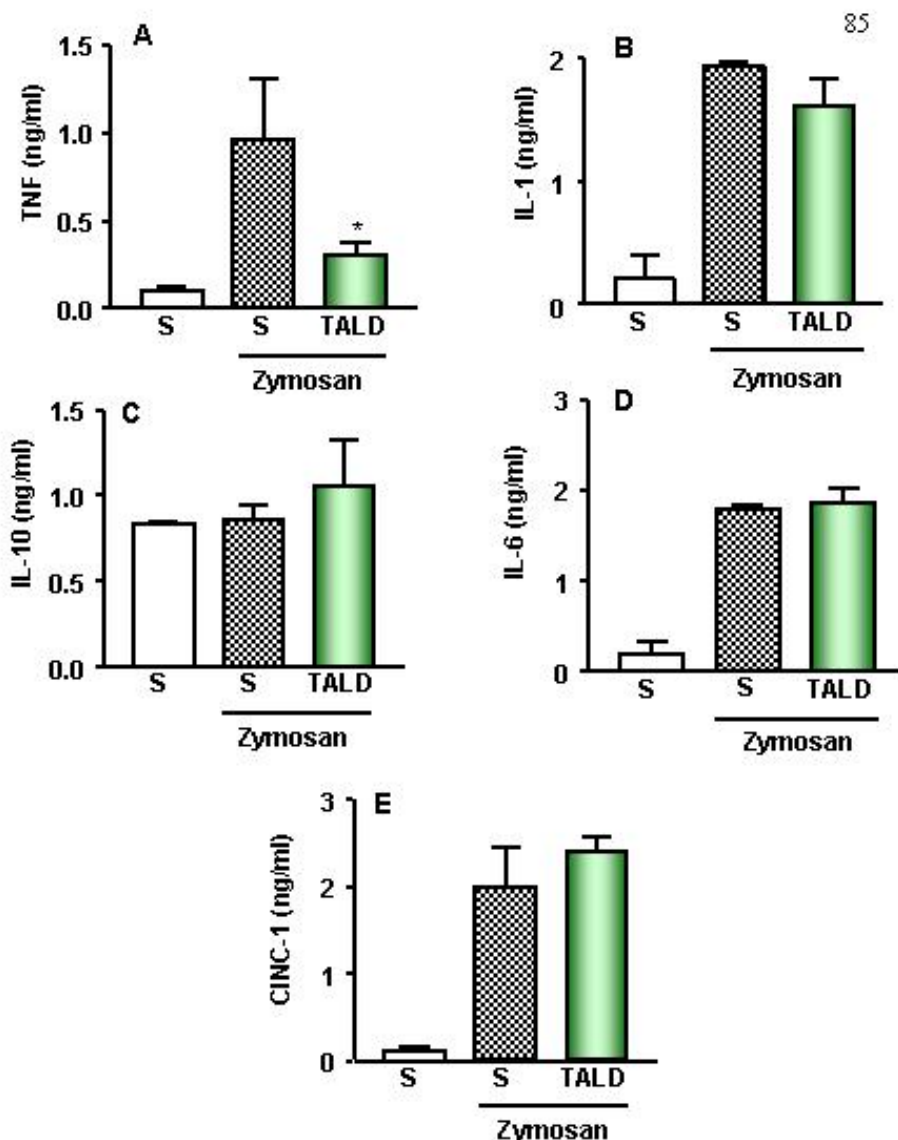


FIGURA.11. Efeito da talidomida sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. Zymosan (1 mg/kg) foi administrado intrarticular em joelho de ratos previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou talidomida (45 mg/kg; TALD). Duas horas após a injeção do zymosan a cavidade articular foi lavada e no sobrenadante obtido foram dosados os níveis de TNF (painel A), IL-1 β (painel B), IL-10 (painel C), IL-6 (painel D) ou CINC-1 (painel E) por espectrofotometria (ELISA). As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada TNF, IL-1 β , IL-10, IL-6 ou CINC-1 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina como pré-tratamento (* $p < 0.05$; Turkey – ANOVA).

10. Efeito da talidomida, *in vivo*, nos níveis de RNAm para TNF induzido por zymosan em camundongos.

A injeção i.p. de zymosan (1mg/animal) em camundongos induziu um aumento nos níveis de RNAm para TNF murino determinado por RT-PCR em células peritoneais colhidas 30 min após a injeção de zymosan. Talidomida (45 mg/kg) administrada 30 min antes do zymosan reduziu os níveis de RNAm para TNF mas não afetou os níveis do RNAm para β -actina (Figura 12).

11. Efeito do tratamento com talidomida na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.

Talidomida (45 mg/kg) foi administrada previamente a carragenina (100 μ g/pata) na dose em que demonstrou antinocicepção máxima no teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato. Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na hiperalgesia mecânica. Foi observado que carragenina induziu a produção de TNF por células residentes demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (figura 13 C). O pré-tratamento com talidomida diminuiu visivelmente a marcação por imunohistoquímica (figura 13 D).

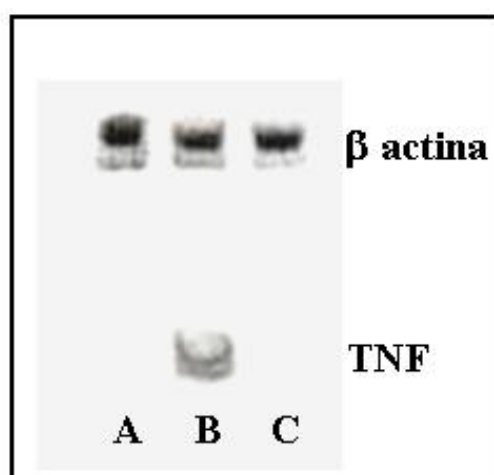


FIGURA 12. Efeito da administração sistêmica de talidomida sobre o nível de RNAm para TNF *in vivo* de células colhidas da cavidade peritoneal de camundongos injetados com zymosan. Os níveis de RNAm para TNF e β -actina em células peritoneais colhidas de camundongos injetados 30 min antes com salina (linha A), zymosan (linha B) ou talidomida (45mg/kg) e zymosan (linha C). RT-PCR foi realizado como descrito em materiais e métodos. Os resultados são similares ao presente em dois experimentos adicionais.

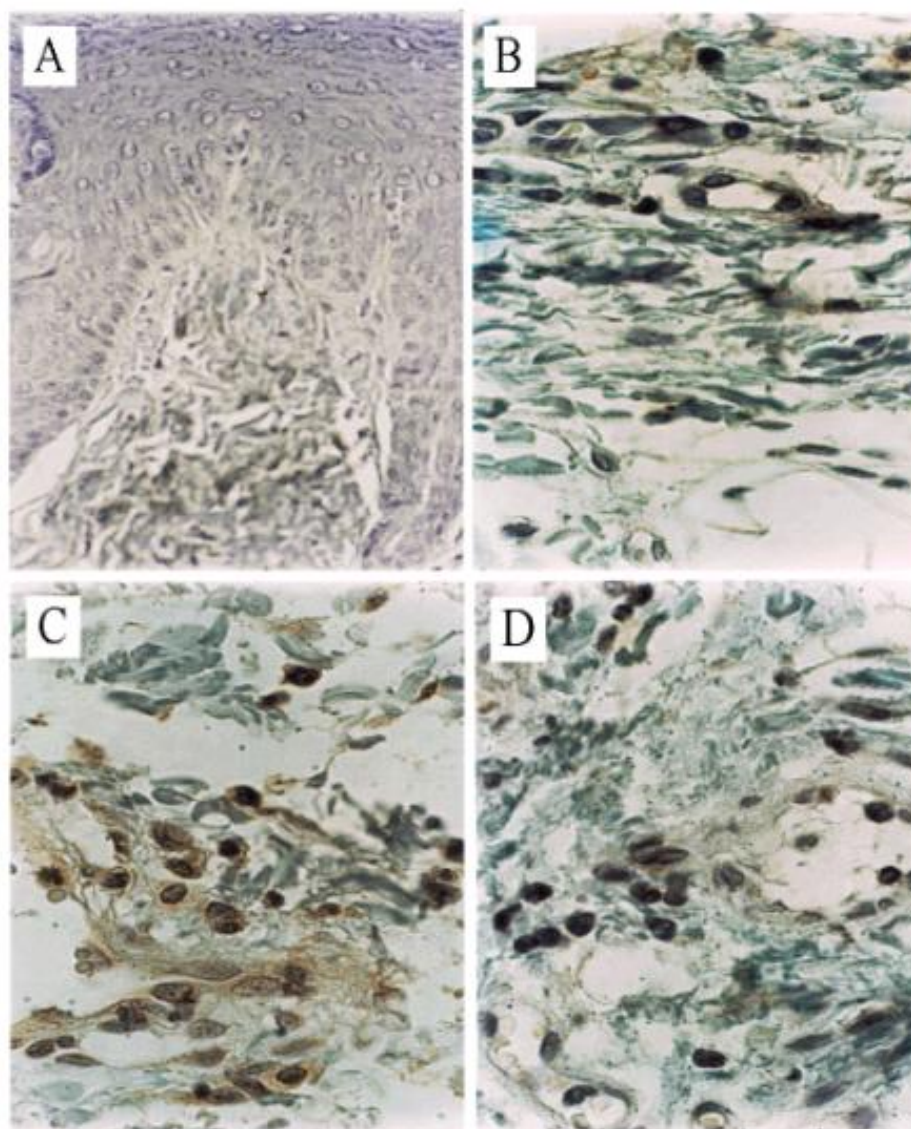


FIGURA 13. Tratamento com talidomida reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com carragenina. A: Controle negativo da marcação por imunohistoquímica para TNF de pata de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina; ausência do anticorpo primário anti-TNF de rato. B: Ausência de marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata tratada somente com salina. C: Intensa marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.). D: Ausência da marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata de animal pré-tratado com talidomida (45 mg/kg; i.p.) e estimulado com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.).

12. Efeito da pentoxifilina na atividade nociceptiva do zymosan, ácido acético e iloprost no modelo de contorções abdominais.

A injeção intraperitoneal de pentoxifilina 30 min antes do estímulo, foi capaz de reduzir de forma significativa e dose-dependente as contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal, i.p.; Figura 14A) ou ácido acético (0.6%, i.p.; Figura 14B) sendo o bloqueio significativo apenas nas doses de 1.6 e 5 mg/kg quando o estímulo foi zymosan com 82.9% e 58.5% ($p < 0.001$ na resposta máxima) de inibição respectivamente e 52.3%, 89.8% e 47.6% ($p < 0.001$) de inibição respectivamente para as doses de 0.5, 1.6 e 5, quando o estímulo utilizado foi o ácido acético. No entanto a maior dose de PTX (45 mg/kg) não produziu efeito inibitório sobre a atividade desses dois estímulos e quando a dose de zymosan é rebaixada observamos um discreto aumento das contorções abdominais por PTX nesta mesma dose (figura 15 A). Quando o estímulo utilizado foi o iloprost foi observado uma amplificação do número de contorções com a dose maior de PTX (45 mg/kg) e uma ausência de inibição das contorções abdominais quando utilizou-se a dose de 1.6 mg/kg (Figura 15 B)

13. Efeito pré-tratamento com pentoxifilina sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular em joelho de rato.

Pentoxifilina foi administrada por via i.p. nas doses de 0.5 a 45 mg/kg, 30 min antes da injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 μ l). Na Figura 16 a cinética mostra que o pico de incapacitação ocorreu na 3^a hora e que pentoxifilina inibiu a incapacitação articular (Δ tempo de suspensão da pata), de modo significativo, na 2^a hora (89%, $p < 0.01$, dose de 1.6mg/kg), na 3^a hora (73.6% e 63.8%, $p < 0.01$, respectivamente para as doses de 1.6 e 5 mg/kg) e na 4^a hora (80.3%, $p < 0.01$, para a dose de 1.6 mg/kg).

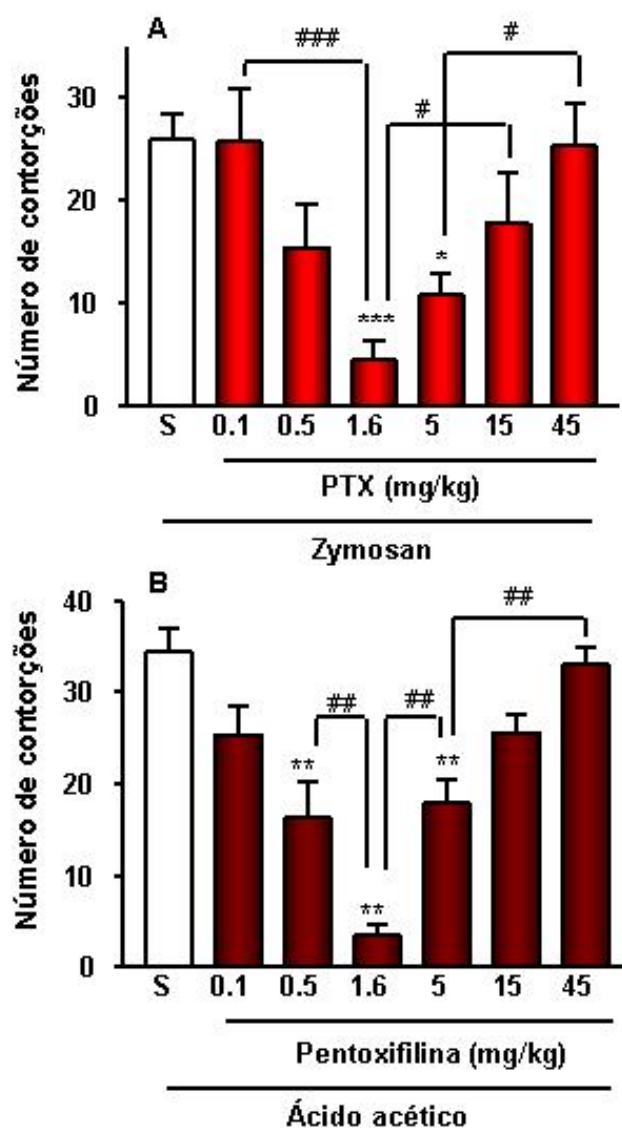


FIGURA 14. Efeito antinociceptivo da pentoxifilina nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan. Zymosan (1 mg/animal; Painel A) ou Ácido acético (0.6%; Painel B) foi administrado por via i.p. em camundongos Swiss previamente tratados (30 min antes; i.p.) com salina (controle – S) ou pentoxifilina (0,1 - 45 mg/kg; PTX). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva em grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e os sustentados indicam diferença estatística entre os grupos pré-tratados com PTX (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$; Turkey - ANOVA).

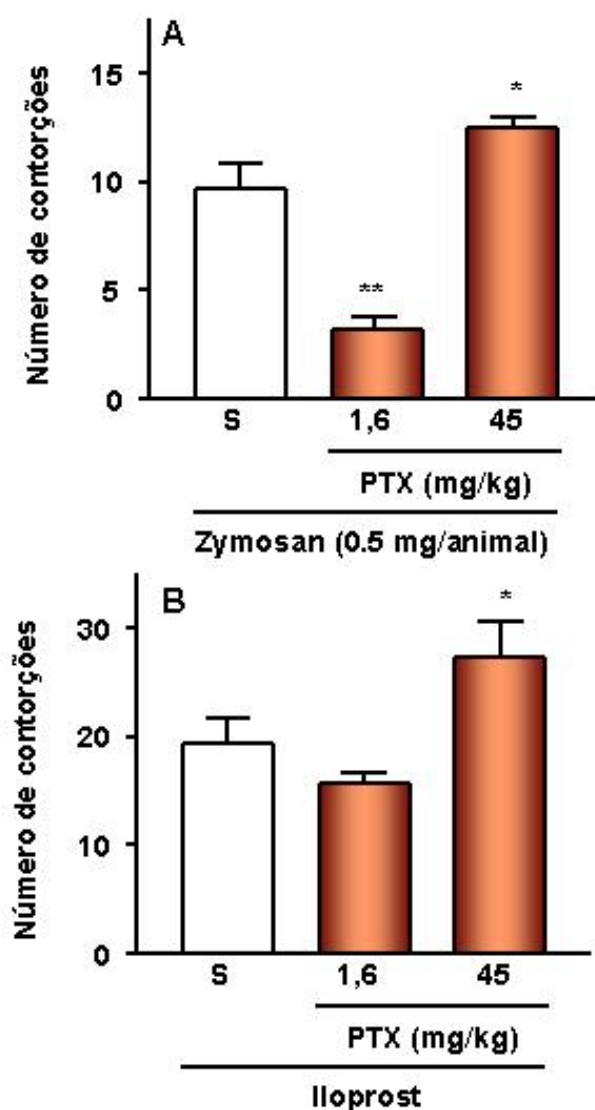


FIGURA 15. Efeito da pentoxifilina nas contrações abdominais induzidas por zymosan (0.5 mg/animal) ou iloprost (0.5 µg/animal). Zymosan (0.5 mg/animal, Painel A) Iloprost (0.5 µg/animal; Painel B) foi administrado por via i.p. em camundongos Swiss previamente tratados (30 min antes; i.p.) com salina (controle – S) ou pentoxifilina (1.6 e 45 mg/kg; PTX). As barras representam as médias ± EPM do número total de contrações ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva em grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (*p<0.05 e **p<0.01; Turkey – ANOVA)

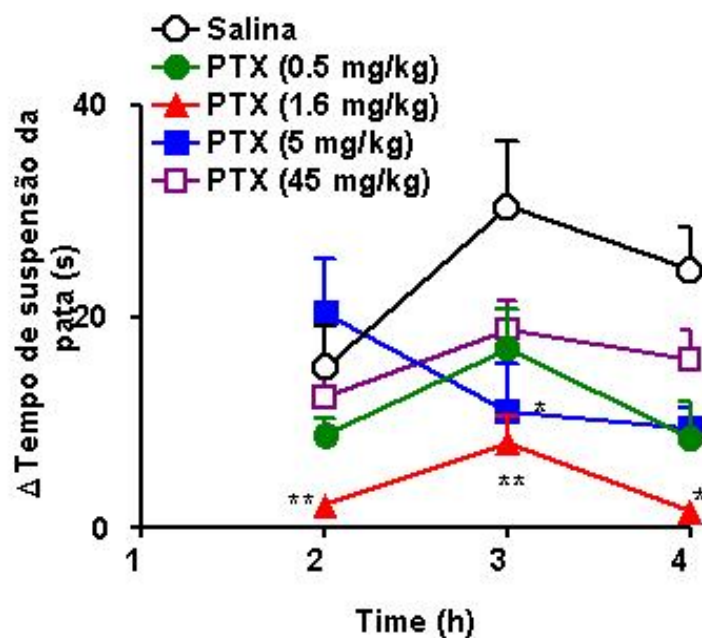


FIGURA 16. Efeito antinociceptivo da pentoxifilina sobre a incapacitação articular induzida por zymosan. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos previamente tratados por via i.p. com salina (controle, S) ou pentoxifilina (0.5 - 45 mg/kg; PTX). Durante 60 segundos, a cada 1 hora, foi analisado o tempo de suspensão da pata do animal. Os pontos representam a média \pm EPM do tempo de suspensão da pata de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

14. Efeito da pentoxifilina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por carragenina

Pentoxifilina (0.5 – 45 mg/kg) por via i.p. ou via intraplantar (1 – 9 mg/pata) foi administrada 30 min antes do estímulo carragenina (100 µg/pata). Foi observada inibição significativa de 42.3% e 52.3% ($p < 0.001$) para as doses de 15 e 45 mg/kg respectivamente, na 3^a hora (figura 17, painel B) quando o pré-tratamento foi feito por via i.p. A figura 18 painel A mostra que pentoxifilina inibe a hiperalgesia de forma significativa na 3^a e 5^a hora após a administração do estímulo com 73,3% ($p < 0.001$) de inibição máxima na 3^a hora (pico de hiperalgesia) para a dose de 9 mg/pata. O Painel B da figura 18 mostra a inibição de forma dose dependente da PTX na 3^a hora de hiperlgesia. Quando PTX é administrada 1 hora após o estímulo observamos uma inibição de 60%, no entanto quando administrada 2 horas após o estímulo não observamos efeito inibitório sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (figura 19)

15. Efeito do pré-tratamento com pentoxifilina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou prostaglandina E₂ (PGE₂).

Pentoxifilina (9 mg/pata) por via intraplantar foi injetada 30 min antes dos estímulos bradicinina (500 ng/pata), TNF (2.5 pg/pata), IL-1 (1 pg/pata) ou PGE₂ (100 ng/pata). A figura 20 mostra que pentoxifilina inibe de forma significativa a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina e TNF em 55.2% e 45.6% ($p < 0.001$) respectivamente, mas não a por IL-1 ou PGE₂ quando comparado ao grupo pré-tratado com salina.

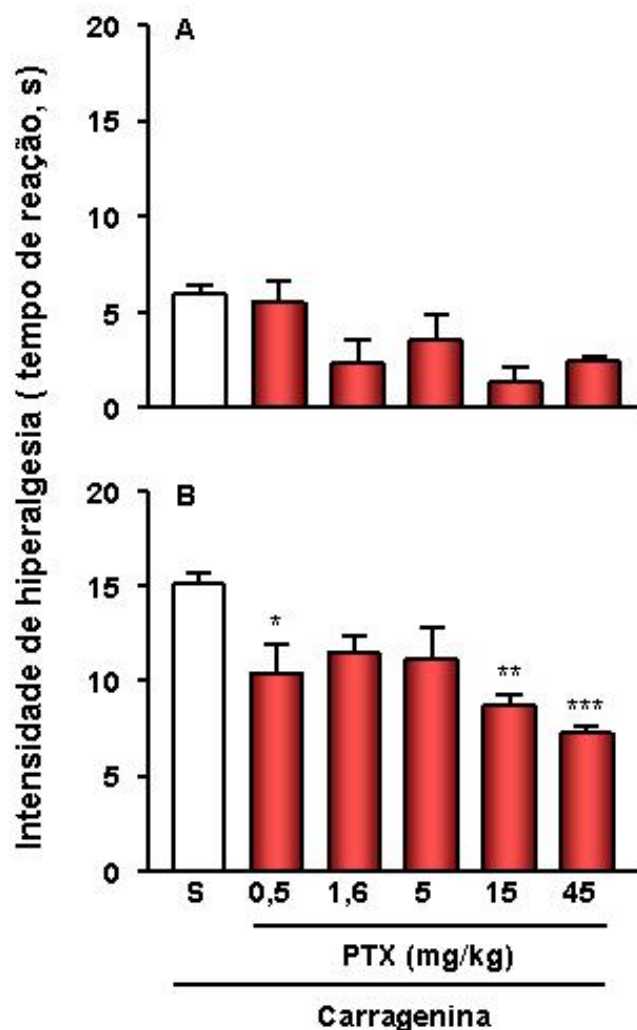


FIGURA 17. Efeito da administração sistêmica de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Carragenina ($100 \mu\text{g/pata}$) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, S) ou pentoxifilina (0.5 – 45 mg/kg, PTX) por via i.p. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica na 1ª (painel A) e na 3ª (painel B) hora. As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) de grupos de 5 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$; Turkey – ANOVA).

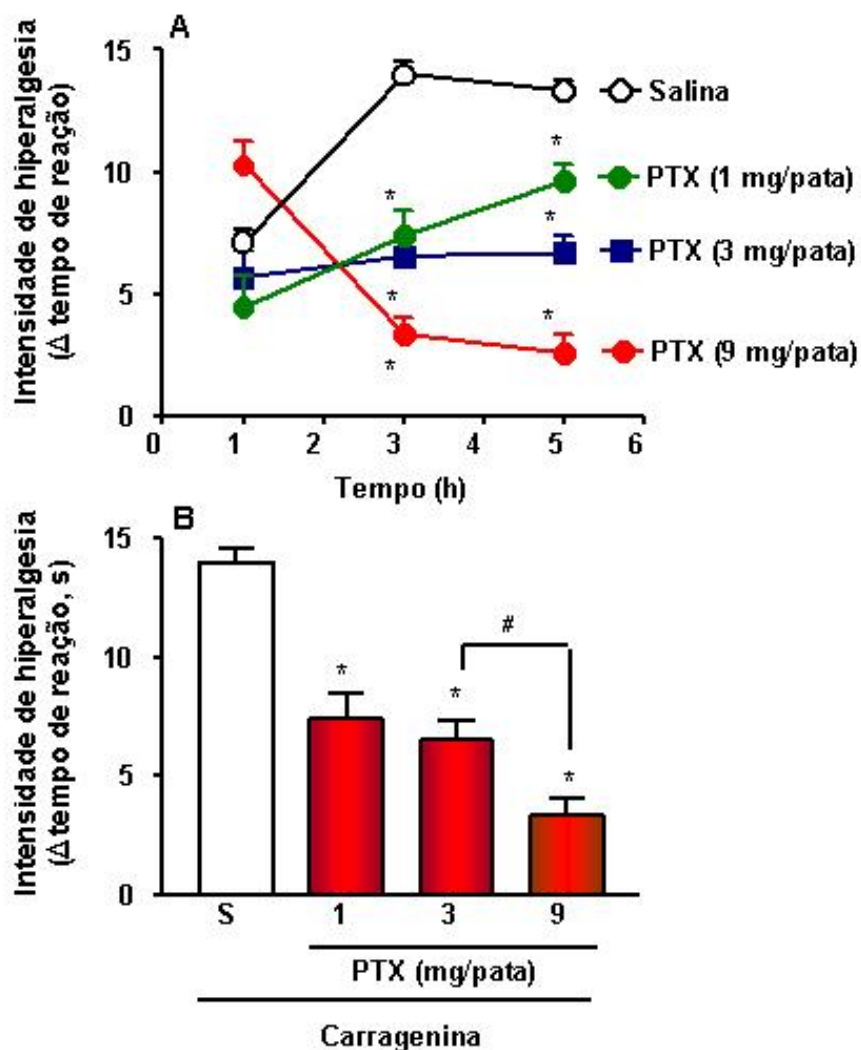


FIGURA 18. Efeito da administração local de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Carragenina (100 μg/pata) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, não tratados S) ou pentoxifilina (1 – 9 mg/pata, PTX) por via intraplantar. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica na 1^a, 3^a e 5^a hora. Os pontos (painel A) representam a média ± EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) em função do tempo em horas. O Painel B representa a média ± EPM do Δ tempo de reação realizado na 3^a hora após a injeção do estímulo (pico de hiperalgesia) de grupos de 5 animais. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle (* p<0.001; Turkey – ANOVA) e o sustenido indica diferença estatística entre os grupos pré-tratados com PTX (# p<0.01; Turkey - ANOVA).

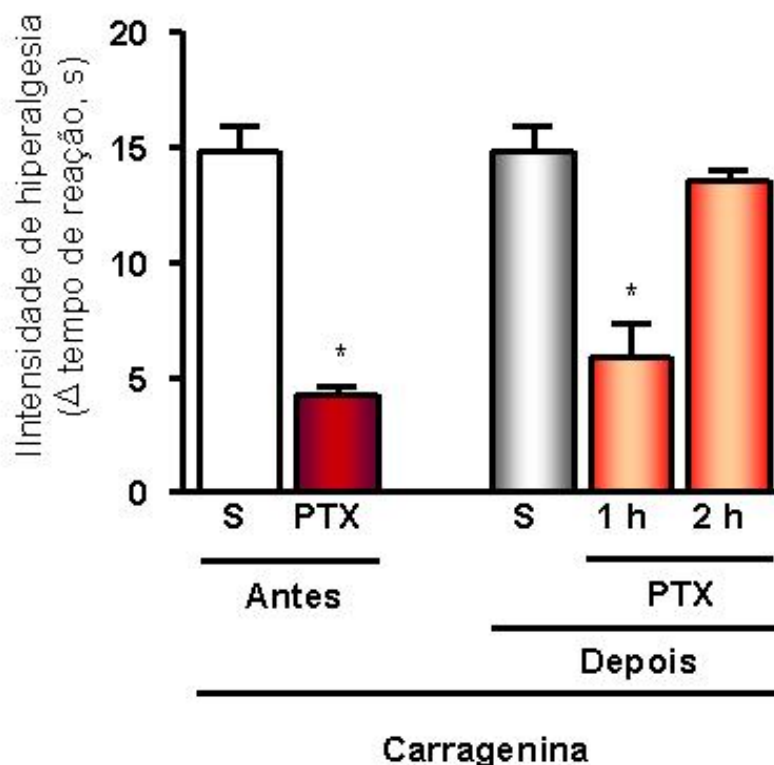


FIGURA 19. Efeito do pós-tratamento com pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Pentoxifilina (9 mg/pata; PTX) foi administrada intraplantar antes (30 min) ou depois (1 h e 2 h) da injeção da substância hiperalgésica carragenina (100 μg/pata; intraplantar). A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e 3 h após administração da substância hiperalgésica (pico de hiperalgesia). As barras representam a média ± EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) de grupos de 5 animais. Os controles (salina-S) receberam salina, intraplantar, 30 min antes ou 1 h após o estímulo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle respectivo (* p<0.001; Turkey – ANOVA).

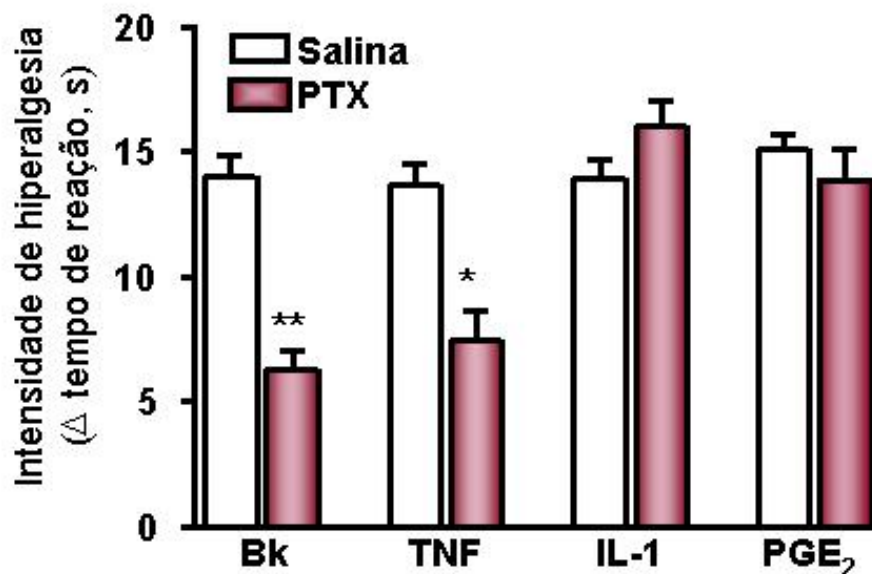


FIGURA 20. Efeito da administração local de pentoxifilina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral, interleucina-1 ou prostaglandina E_2 . Bradicinina (500ng/pata; Bk), fator de necrose tumoral (2.5 pg/pata; TNF), interleucina-1 (1 pg/pata; IL-1) ou prostaglandina E_2 (100 ng/pata; PGE₂) foram administrado por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle - S) ou pentoxifilina (9 mg/pata; PTX) por via intraplantar. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica. As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero), realizado na 3ª hora após a injeção do estímulo (pico de hiperalgesia), em grupos de 5 animais. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* p <0.01 e ** p <0.001; Turkey – ANOVA).

16. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela injeção prévia de pentoxifilina nas contorções abdominais induzidas por zymosan.

Naloxona (2 mg/kg,; s.c.) quando injetada antes da administração de pentoxifilina (1.6 mg/kg, i.p.; dose de maior efeito) não foi capaz de reverter o bloqueio das contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal; i.p.) quando comparada ao grupo pré-tratado somente com pentoxifilina na mesma dose. No entanto a mesma dose de naloxona foi capaz de reverter completamente o bloqueio das contorções abdominais por morfina (5mg/kg), quando este grupo é comparado ao grupo pré-tratado somente com morfina (Figura 21).

17. Efeito da pentoxifilina sobre o tempo de reação no teste da placa quente.

Pentoxifilina (1.6mg/kg; doses de maior efeito no teste de contorção abdominal), a exemplo do observado com a indometacina ou salina, quando dada por via ip, não foi capaz de modificar o tempo de reação dos animais no teste da placa quente (Figura 22). Efeito este diferente da morfina (5 mg/kg; ip) que foi capaz de aumentar esse tempo em até 100% ($p < 0,001$; maior efeito).

18. Efeito da pentoxifilina na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados *in vivo* com zymosan.

Pentoxifilina (0.5 - 45 mg/kg) foi capaz de inibir em até 87.5% ($p < 0.01$; dose de 1.6 mg/kg) a liberação de TNF (Figura 23 painel A) e em até 97% a liberação de IL-1 β mas não a liberação de IL-10 (Figura 23, painel B e C) por macrófagos peritoneais quando injetada, *in vivo*, 30 min antes do estímulo zymosan, na mesma dose capaz de induzir contorções abdominais (1 mg/animal). A inibição da liberação de TNF e IL-1 por pentoxifilina foi constatada pela dosagem das mesmas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos obtidos das cavidades previamente tratadas com pentoxifilina e estimuladas com zymosan. Para tal utilizou-se imunoensaio específico para cada citocina já descrito anteriormente.

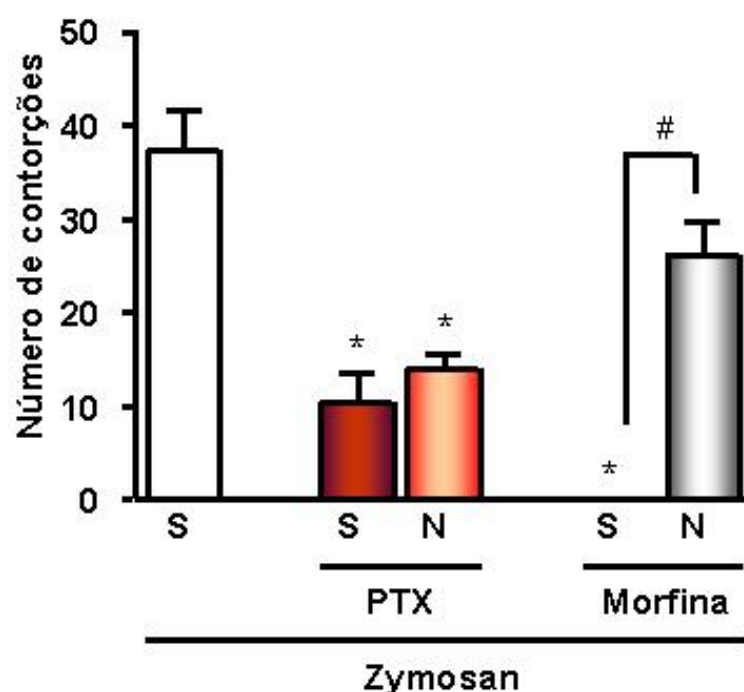


FIGURA 21. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da pentoxifilina e morfina nas contorções abdominais induzidas por zymosan. Pentoxifilina (1.6 mg/kg; PTX) foi administrada por via i.p. em camundongos Swiss pré-tratados 15 min antes com salina (S) ou naloxona (2 mg/kg; N) por via s.c. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via i.p. 30 min após a pentoxifilina. Um experimento controle foi feito para certificar a eficácia da naloxona onde salina (S) ou naloxona (2mg/kg; N) foram administradas s.c. 15 min antes da morfina (5 mg/kg; M) e após 15 min foi administrado o estímulo (zymosan). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções abdominais ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu somente salina (s) como pré-tratamento (* $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e os sustentados indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu morfina (# $p < 0.001$; Turkey – ANOVA).

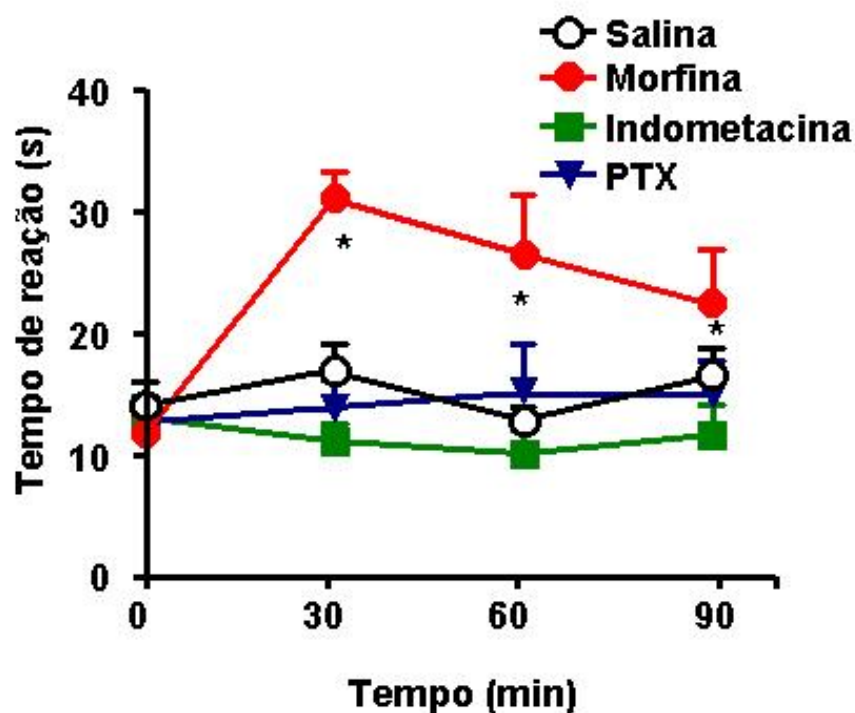


FIGURA 22. Efeito da pentoxifilina sobre o tempo de reação no teste da placa quente. Salina, morfina (5 mg/kg), indometacina (2 mg/kg) ou pentoxifilina (1.6 mg/kg; PTX) foram administradas por via ip imediatamente após a medição do tempo zero. O tempo de reação foi medido em intervalos de 30 min até os 90min. Os pontos representam a média \pm EPM do tempo de reação em segundos de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina (* $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

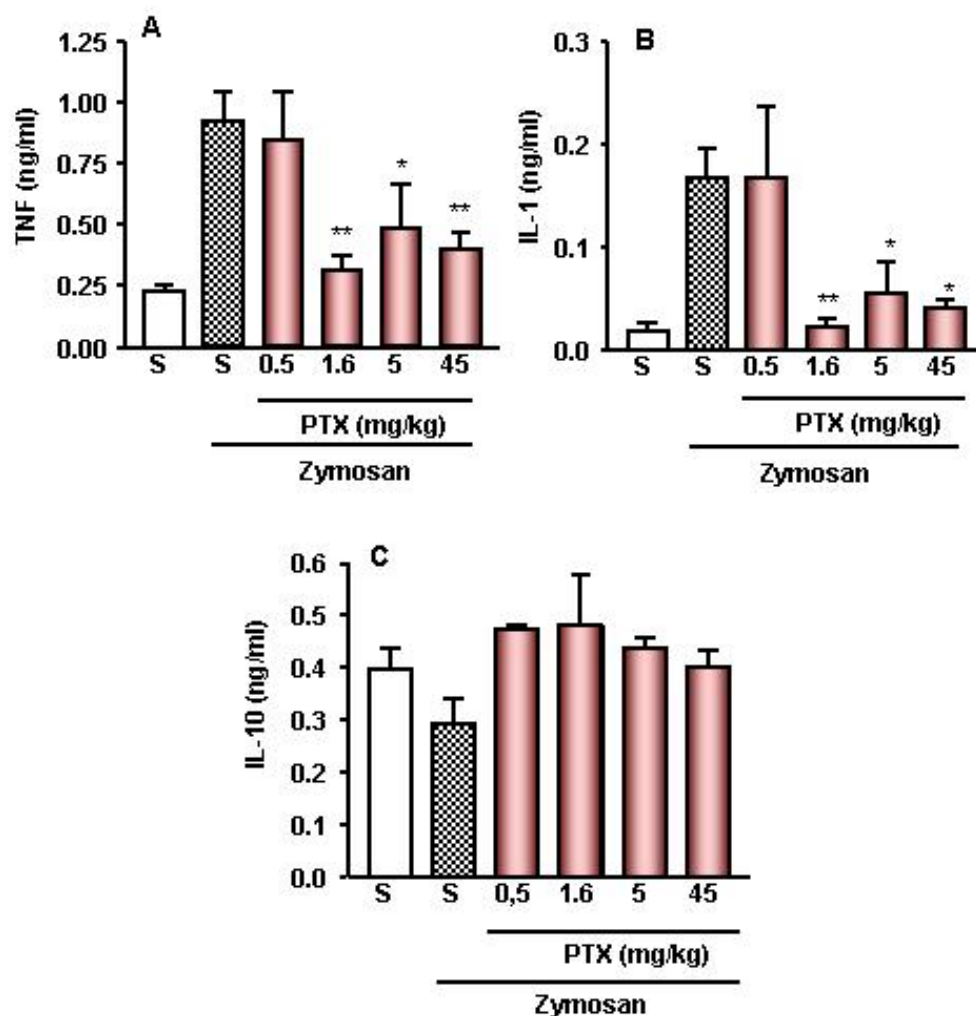


FIGURA 23. Efeito da pentoxifilina na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas in vivo com zymosan. Zymosan (1 mg/kg) foi administrado em camundongos Swiss previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou pentoxifilina (0.5 - 45 mg/kg; PTX). Quinze minutos após a injeção do zymosan as células peritoneais foram colhidas e postas em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi colhido e TNF (painel A), IL-1 β (painel B) ou IL-10 (painel C) foram dosados por espectrofotometria (ELISA). O grupo denominado S recebeu somente salina. As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada TNF, IL-1 β ou IL-10 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle que recebeu salina como pré-tratamento (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

19. Efeito da pentoxifilina sobre liberação de citocinas na a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan

Pentoxifilina na dose que induziu o maior efeito no bloqueio da incapacitação articular (1.6 mg/kg) foi capaz de inibir em 53.9% ($p < 0.01$) a liberação de TNF (Figura 24, painel A) e em 47% a liberação de IL-1 β ($p < 0.01$, figura 24, painel B) mas não a liberação de IL-10, IL-6 ou CINC-1 (Figura 24, painel C, D e E) para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan na mesma dose capaz de induzir incapacitação articular (1 mg/cavidade). A inibição da liberação de TNF e IL-1 por pentoxifilina foi constatada pela dosagem das mesmas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos obtidos das cavidades previamente tratadas com pentoxifilina e estimuladas com zymosan. Para tal utilizou-se imunensaio específico para cada citocina já descritos anteriormente.

20. Efeito do tratamento com pentoxifilina na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.

Pentoxifilina (9mg/pata) foi administrada previamente a carragenina (100 μ g/pata) dose em que demonstrou antinocicepção máxima no teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato. Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na hiperalgesia mecânica. Foi observado que carragenina induziu a produção de TNF por células residentes demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (figura 25 C). O pré-tratamento com talidomida e pentoxifilina diminuiu visivelmente a marcação por imunohistoquímica (figura 25 D).

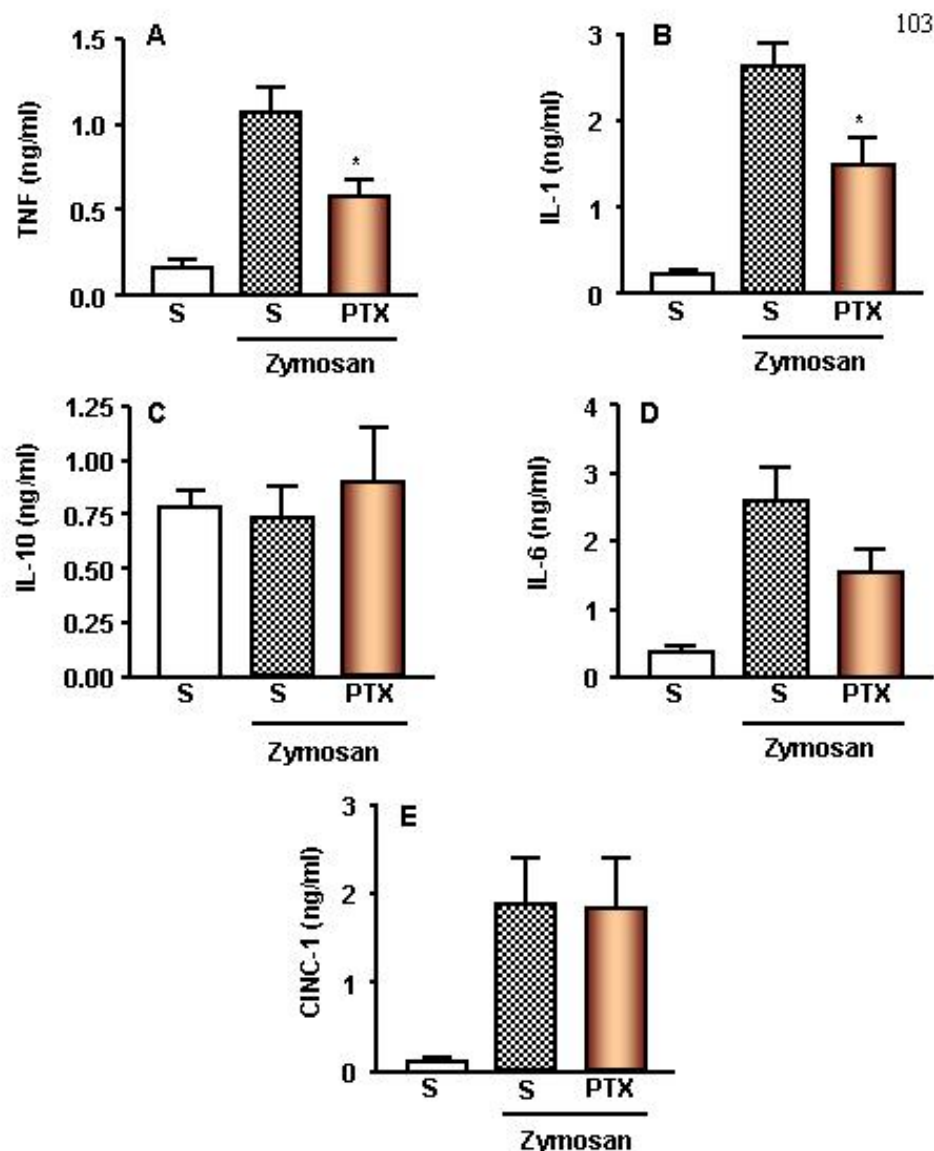


FIGURA 24. Efeito da pentoxifilina sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1b), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. Zymosan (1 mg/cavidade) foi administrado intrarticular em joelho de ratos previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou pentoxifilina (1.6 mg/kg; PTX). Duas horas após a injeção do zymosan a cavidade articular foi lavada e no sobrenadante obtido foram dosados os níveis de TNF (painel A), IL-1 β (painel B), IL-10 (painel C), IL-6 (painel D) ou CINC-1 (painel E) por espectrofotometria (ELISA). O grupo denominado S recebeu somente salina. As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada. TNF, IL-1b, IL-10, IL-6 ou CINC-1 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina como pré-tratamento (* $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

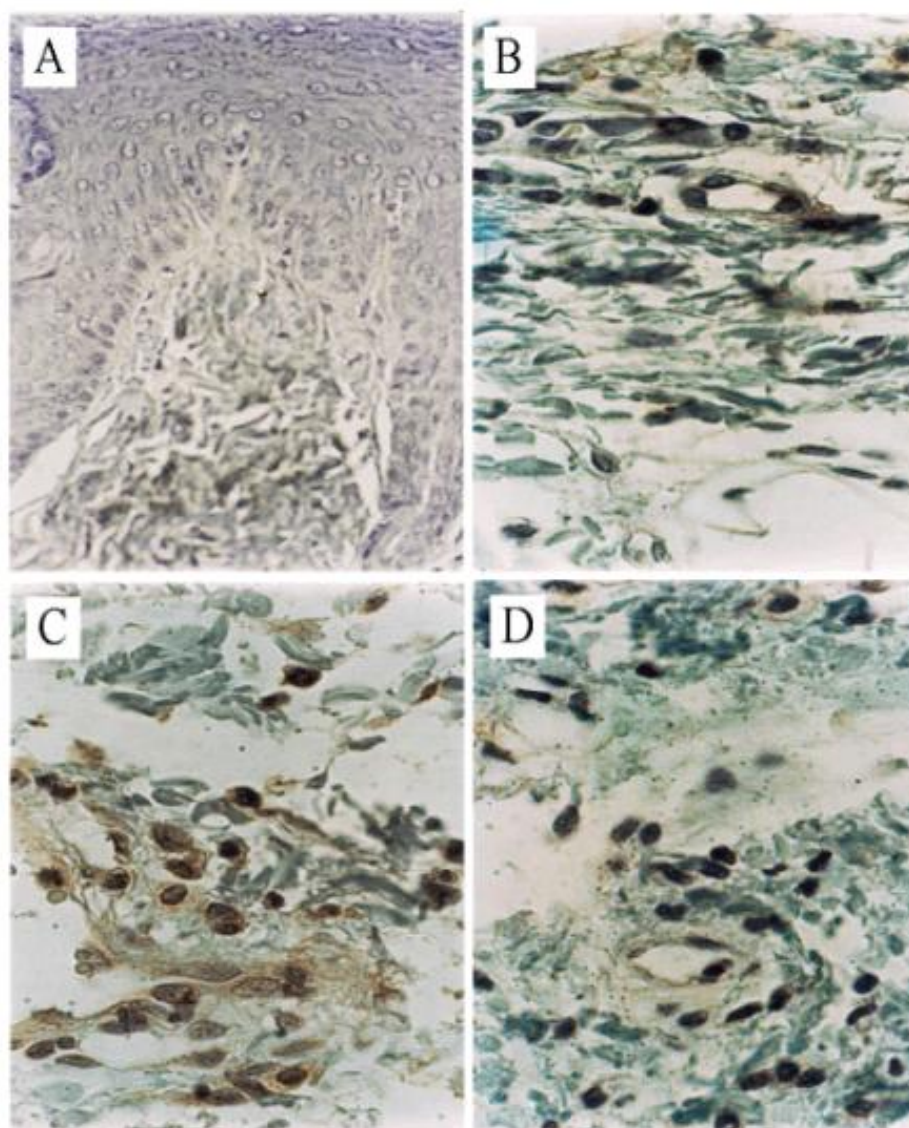


FIGURA 25. Tratamento com pentoxifilina reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com carragenina. A: Controle negativo da marcação por imunohistoquímica para TNF de pata de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina; ausência do anticorpo primário anti-TNF de rato. B: Ausência de marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata tratada somente com salina. C: Intensa marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.). D: Ausência da marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata pré-tratada com pentoxifilina (9 mg/pata; i.pl.) e estimulado com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.).

21. Efeito da clorpromazina no teste de contorções abdominais induzido por zymosan, ácido acético ou iloprost.

A injeção intraperitoneal de clorpromazina nas doses de 0.1, 0.3 e 1.0 mg/kg, 30 min antes do estímulo, foi capaz de reduzir de forma dose-dependente as contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal, i.p.; Figura 26 painel A) ou ácido acético (0.6%, i.p.; Figura 26 painel B) sendo o bloqueio significativo em todas as doses quando o estímulo utilizado foi o zymosan com 35%, 41.6% e 63.7% ($p < 0.001$ na resposta máxima) de inibição respectivamente e apenas para as doses de 0.3 e 1.0 mg/kg com 62.6% e 89% ($p < 0.001$) de inibição respectivamente, quando o estímulo utilizado foi o ácido acético. Clorpromazina não foi capaz de inibir de modo significativo as contorções abdominais induzidas por iloprost (Figura 27).

22. Efeito do pré-tratamento com clorpromazina sobre a atividade nociceptiva do zymosan no modelo de incapacitação articular em joelho de rato.

Clorpromazina foi administrada por via i.p. nas doses de 0.1 a 1 mg/kg, 30 min antes da injeção intrarticular de zymosan (1 mg/animal; 50 μ l). Na Figura 28 a cinética mostra que o pico de incapacitação ocorreu na 3^a hora e que clorpromazina inibiu a incapacitação articular (Δ tempo de suspensão da pata), de modo significativo, na 2^a hora (94%, $p < 0.01$, apenas na dose de 0.3mg/kg), na 3^a hora (99% e 48%, $p < 0.01$, respectivamente para as doses de 0.3 e 1 mg/kg) e na 4^a hora (82%, $p < 0.01$, para a dose de 0.3 mg/kg). Observou-se que a dose de maior eficácia foi a dose de 0.3 mg/kg.

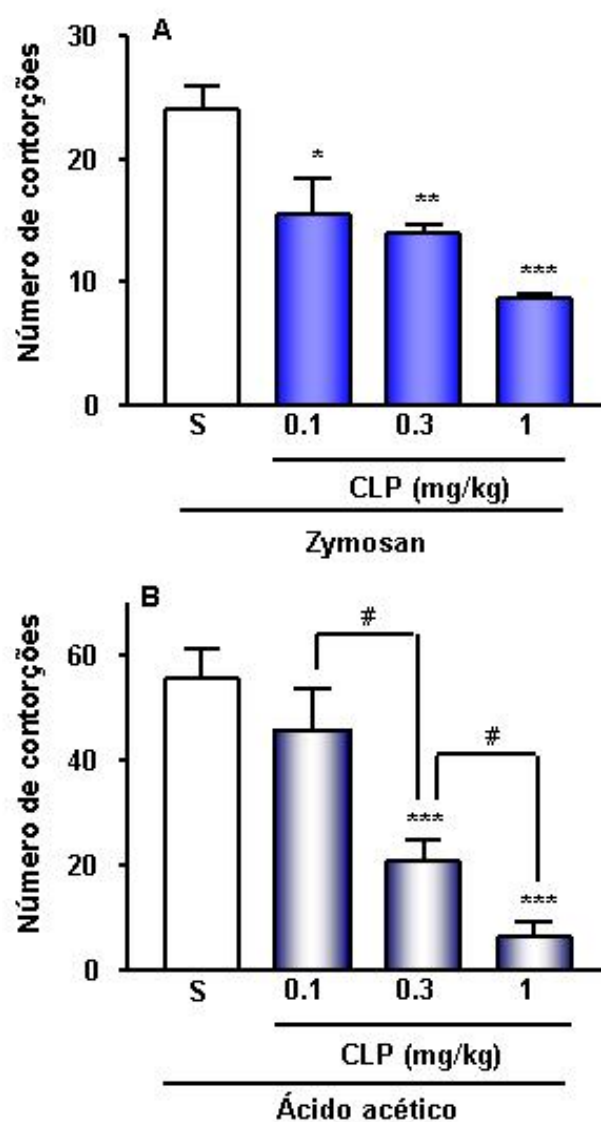


FIGURA 26. Efeito antinociceptivo da clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan. Zymosan (1 mg/animal; Painel A) ou Ácido acético (0.6%; Painel B) foi administrado por via i.p. em camundongos Swiss previamente tratados (30 min antes; i.p.) com salina (controle – S) ou clorpromazina (0,1 - 1 mg/kg; CLP). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e o sustentado indica diferença estatística entre grupos pré-tratados com CLP (# $p < 0.05$; Turkey - ANOVA).

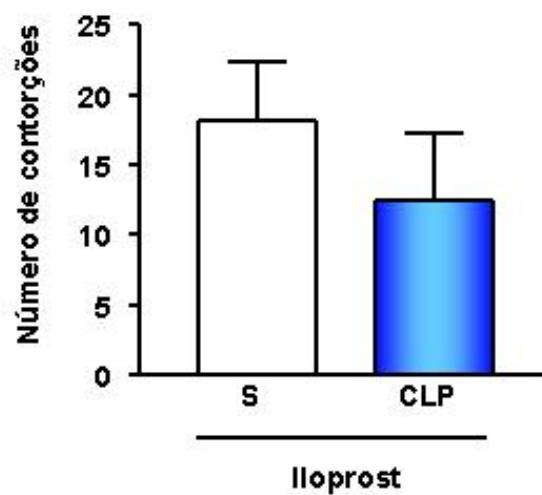


FIGURA 27. **Efeito da clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por iloprost.** Iloprost ($1 \mu\text{g}/\text{animal}$) foi administrado por via i.p. em camundongos Swiss previamente tratados (30 min antes; i.p.) com salina (controle - S) ou clorpromazina ($1 \text{ mg}/\text{kg}$; CLP). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva de grupos de 6 animais.

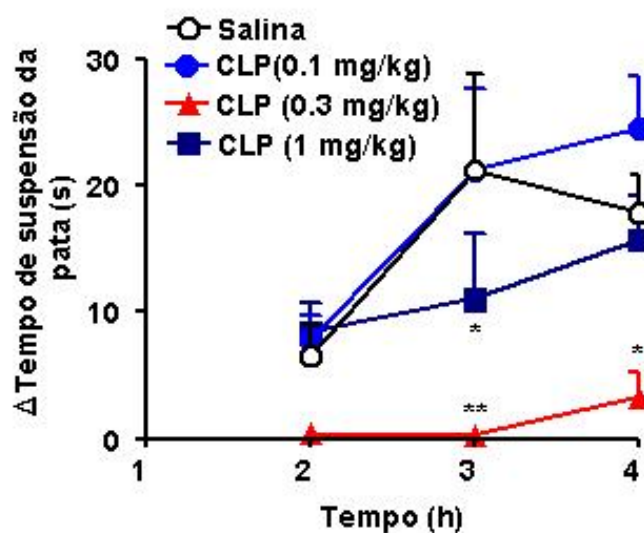


FIGURA 28. Efeito antinociceptivo da clorpromazina sobre a incapacitação articular induzida por zymosan. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos previamente tratados por via i.p. com salina (controle, S) ou clorpromazina (0.1 - 1 mg/kg; CLP). Durante 60 segundos, a cada 1 hora, foi analisado o tempo de suspensão da pata do animal. Os pontos representam a média \pm EPM do tempo de suspensão da pata de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

23. Efeito da clorpromazina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por carragenina

Clorpromazina (0.1 – 1 mg/kg) por via i.p. quando administrada 30 min antes do estímulo carragenina (100 µg/pata) inibiu de forma significativa a hiperalgesia induzida por carragenina em 39% e 65.5% ($p < 0.001$) para as doses de 0,3 e 1 mg/kg respectivamente, na 3^a hora e 41,1% e 68.1% para as mesmas doses ($p < 0.001$) na 5^a hora quando o pré-tratamento foi feito por via i.p. (figura 29 Painel A). O painel B da figura 29 mostra a inibição dose-dependente na 3^a hora de hiperalgesia. Quando administrada por via intraplantar, clorpromazina demonstrou menor efeito inibitório alcançando somente 18% ($p < 0.05$) de inibição (figura 30 B). Clorpromazina também foi capaz de inibir de forma significativa (52%, $P < 0,001$) a atividade hiperalgésica da carragenina mesmo quando administrada 2 horas após o estímulo (Figura 31).

24. Efeito do pré-tratamento com clorpromazina sobre a hiperalgesia em pata de rato induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou prostaglandina E₂ (PGE₂).

Clorpromazina (1 mg/pata) por via i.p. foi injetada 30 min antes dos estímulos bradicinina (500 ng/pata), TNF (2.5 pg/pata), IL-1 (1 pg/pata) ou PGE₂ (100 ng/pata). A figura 32 mostra que clorpromazina inibe de forma significativa a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por todos os estímulos com 58.5%, 42%, 38.8% e 21,14% de inibição respectivamente para bradicinina, TNF, IL-1 e PGE₂ quando comparado ao grupo pré-tratado com salina.

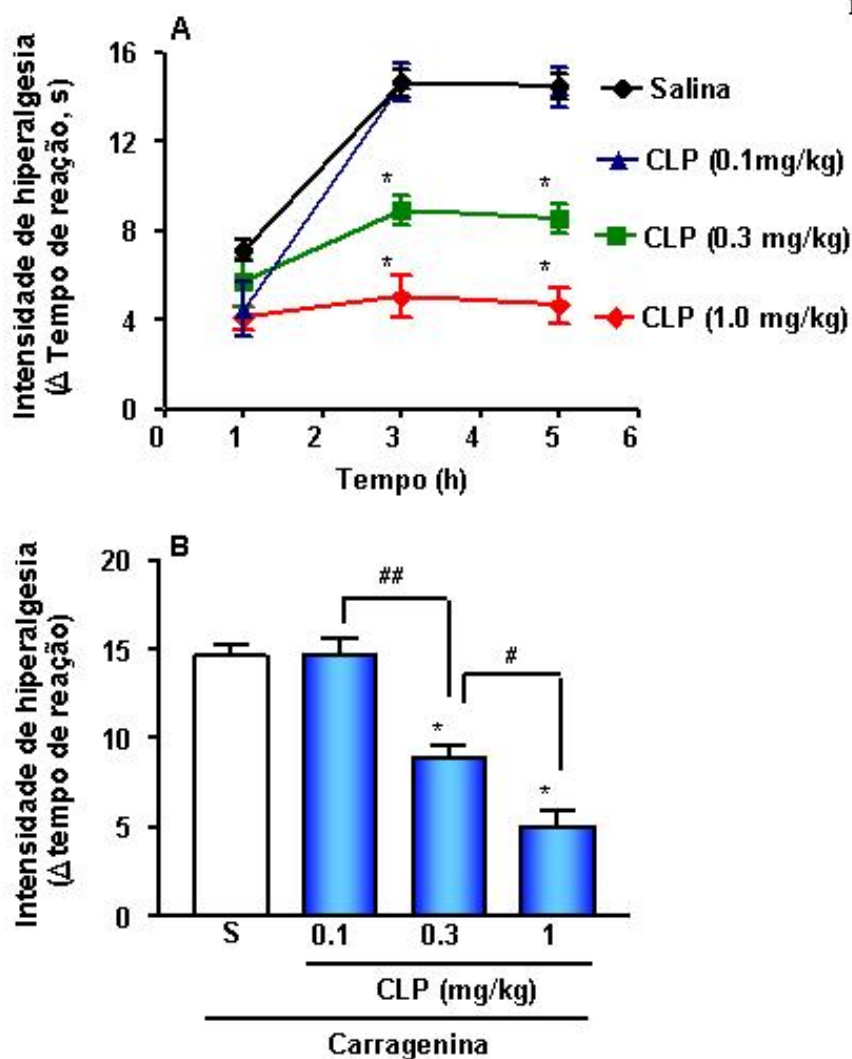


FIGURA 29. Efeito da administração sistêmica de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Carragenina ($100 \mu\text{g/pata}$) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, S) ou clorpromazina (0.1 – 1 mg/kg, CLP) por via i.p. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância nociceptiva na 1^a, 3^a e 5^a hora. Os pontos (painel A) representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) em função do tempo em horas. O Painel B representa a média \pm EPM do Δ tempo de reação realizado na 3^a hora após a injeção do estímulo (pico de hiperalgesia) de grupos de 5 animais. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e os sustenidos indicam diferença estatística entre os grupos pré-tratados com CLP (# $p < 0.01$ e ## $p < 0.001$; Turkey - ANOVA).

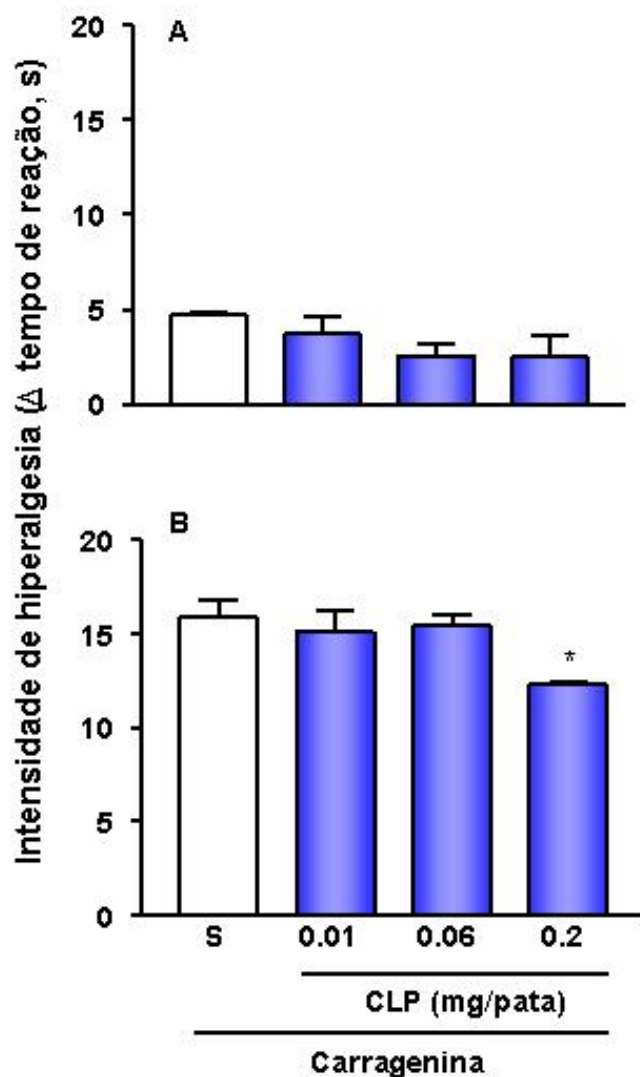


FIGURA 30. Efeito da administração local de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Carragenina ($100 \mu\text{g/pata}$) foi administrada por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle, S) ou clorpromazina (0.01 – 0.2 mg/pata, CLP) por via i.pl. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica na 1ª (painel A) e na 3ª (painel B) hora. As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) de grupos de 5 animais. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao controle (* $p < 0.05$; Turkey – ANOVA).

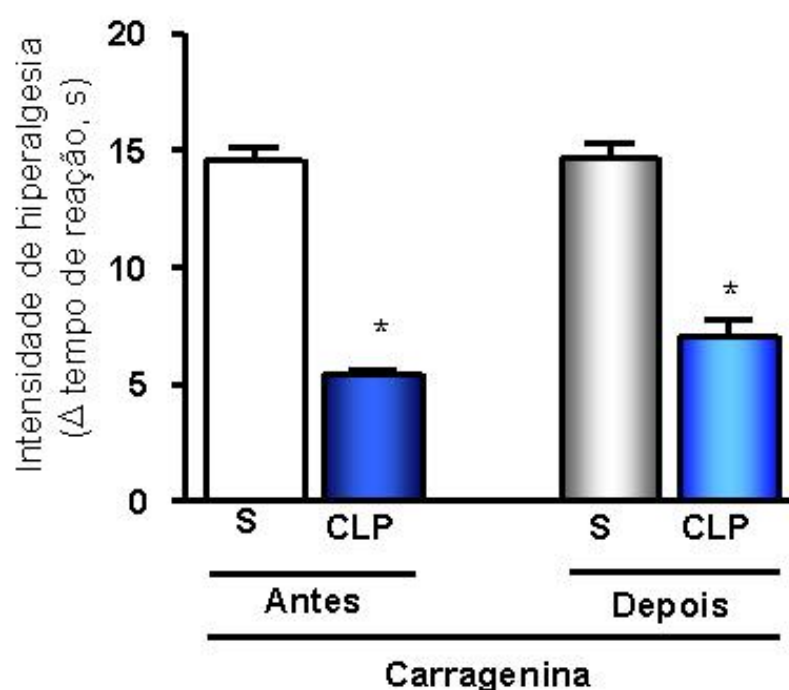


FIGURA 31. Efeito do pós-tratamento com clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por carragenina. Clorpromazina (1 mg/kg; CLP) foi administrada i.p. antes (30 min) ou depois (2 h) da injeção da substância hiperalgésica carragenina (100 μ g/pata; intraplantar). Os controles (s) receberam salina, i.p., 30 min antes ou 2 h depois da injeção da substância hiperalgésica. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e 3 h após administração da substância hiperalgésica (pico de hiperalgesia). As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) de grupos de 5 animais. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0.001$; Turkey – ANOVA).

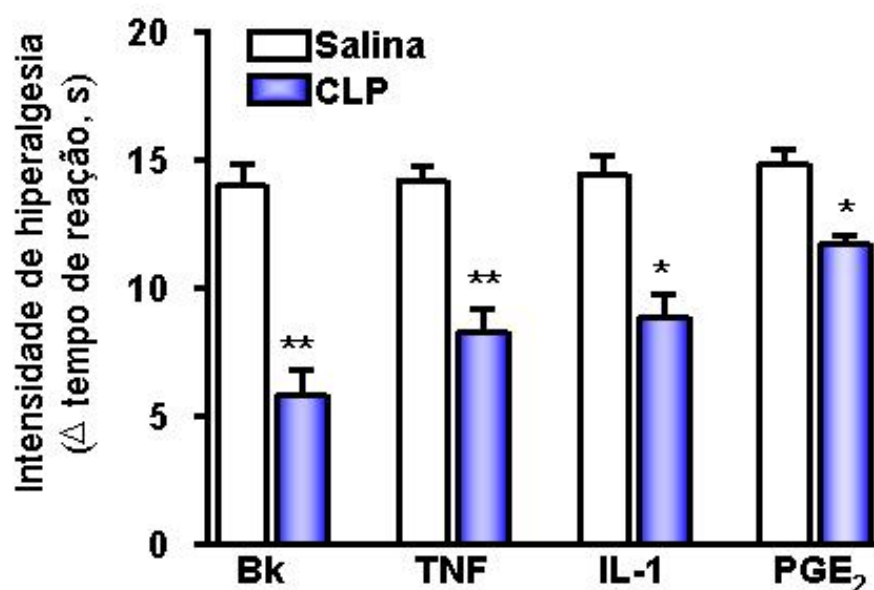


FIGURA 32. Efeito da administração sistêmica de clorpromazina sobre a intensidade de hiperalgesia (Δ tempo de reação) induzida por bradicinina, fator de necrose tumoral, interleucina-1 ou prostaglandina E₂. Bradicinina (500ng/pata; Bk), fator de necrose tumoral (2.5 pg/pata; TNF), interleucina-1 (1 pg/pata; IL-1) ou prostaglandina E₂ (100 ng/pata; PGE₂) foram administrado por via intraplantar em ratos previamente tratados com salina (controle - salina) ou clorpromazina (1 mg/kg; CLP) por via i.p.. A intensidade de hiperalgesia foi medida antes (tempo zero) e após a administração da substância hiperalgésica. As barras representam a média \pm EPM do Δ tempo de reação (diferença entre a medida do tempo após a injeção da substância hiperalgésica e o tempo zero) realizado na 3ª hora após a injeção do estímulo (pico de hiperalgesia) em grupos de 5 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle (*p<0.01 e ** p<0.001; Turkey – ANOVA).

25. Efeito do pré-tratamento com naloxona na antinocicepção obtida pela injeção prévia de clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por zymosan.

Naloxona (2 mg/kg,; s.c.) quando injetada antes da administração de clorpromazina (1mg/kg, i.p.; dose de maior efeito) não foi capaz de reverter o bloqueio das contorções abdominais induzidas por zymosan (1 mg/animal; i.p.) quando comparada ao grupo pré-tratado somente com clorpromazina na mesma dose. No entanto a mesma dose de naloxona foi capaz de reverter completamente o bloqueio das contorções abdominais por morfina (5mg/kg), quando este grupo é comparado ao grupo pré-tratado somente com morfina (Figura 33).

26. Efeito da clorpromazina sobre o tempo de reação no teste da placa quente.

Clorpromazina (1mg/kg; doses de maior efeito no teste de contorção abdominal), a exemplo do observado com a indometacina ou salina, quando dada por via ip, não foi capaz de modificar o tempo de reação dos animais no teste da placa quente (Figura 34). Efeito este diferente da morfina (5 mg/kg; ip) que foi capaz de aumentar esse tempo em até 100% ($p < 0,001$; maior efeito).

27. Efeito da clorpromazina na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais residentes murinos estimulados *in vivo* com zymosan.

Clorpromazina na dose que induziu o maior efeito no bloqueio das contorções abdominais (1 mg/kg) foi capaz de inibir em 54.04% ($p < 0.05$) a liberação de TNF (Figura 35, painel A) mas não a liberação de IL-1 β ou IL-10 (Figura 35, painel B e C) por macrófagos peritoneais quando injetada *in vivo* 30 min antes do estímulo zymosan, na mesma dose capaz de induzir contorções abdominais (1 mg/animal). A inibição da liberação de TNF- α por clorpromazina foi constatada pela dosagem das mesmas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos obtidos das cavidades peritoneais previamente injetadas com clorpromazina e estimuladas com zymosan. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para cada citocina já descritos anteriormente.

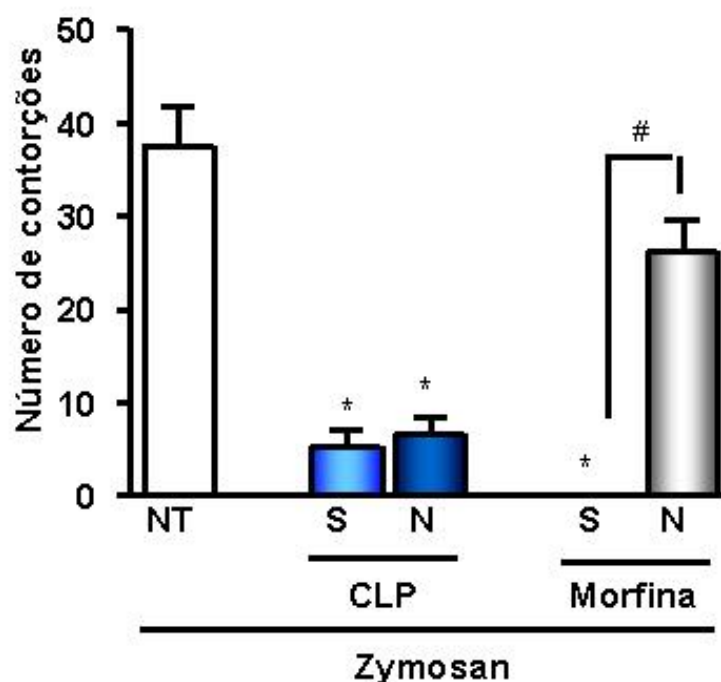


FIGURA 33. Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva da clorpromazina nas contorções abdominais induzidas por zymosan.

Clorpromazina (1 mg/kg; CLP) foi administrada por via i.p. em camundongos Swiss pré-tratados 15 min antes com salina (S) ou naloxona (2 mg/kg; N) por via s.c. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via i.p. 30 min após a clorpromazina. Um experimento controle foi feito para certificar a eficácia da naloxona onde salina (S) ou naloxona (2mg/kg; N) foram administradas s.c. 15 min antes da morfina (5 mg/kg; M) e após 15 min foi administrado o estímulo (zymosan). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções abdominais ocorridas após 30 min da injeção da substância nociceptiva de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu somente salina como pré-tratamento (* $p < 0.001$; Turkey – ANOVA) e os sustentados indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu morfina (# $p < 0.001$; Turkey – ANOVA).

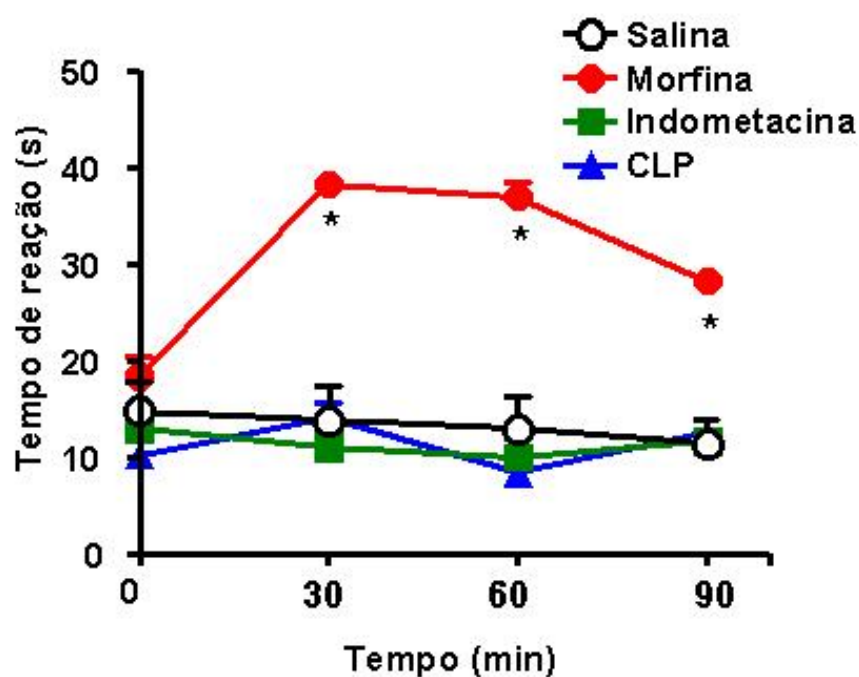


FIGURA 34. Efeito da clorpromazina sobre o tempo de reação no teste da placa quente. Salina, morfina (5 mg/kg), indometacina (2 mg/kg) ou clorpromazina (1 mg/kg; CLP) foram administradas por via i.p. imediatamente após a aferição do tempo zero. O tempo de reação foi medido em intervalos de 30 min até os 90min. Os pontos representam a média ± EPM do tempo de reação em segundos de grupos de 6 animais. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina (*p<0.001; Turkey – ANOVA).

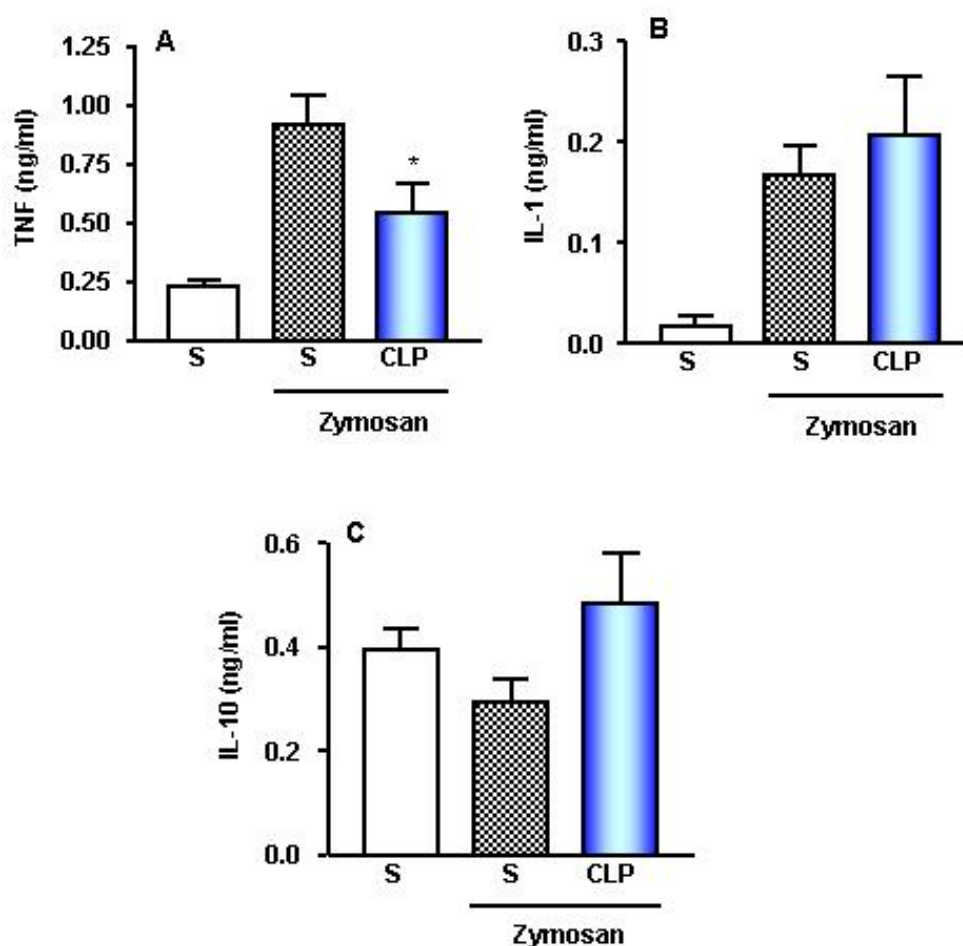


FIGURA 35. Efeito da clorpromazina na liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1b) e interleucina-10 (IL-10) por células peritoneais residentes estimuladas *in vivo* com zymosan. Zymosan (1 mg/kg) foi administrado em camundongos Swiss previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou clorpromazina (1 mg/kg; CLP). Quinze minutos após a injeção do zymosan as células peritoneais foram colhidas e postas em cultura por 12 horas. O sobrenadante foi colhido e TNF (painel A), IL-1 β (painel B) ou IL-10 (painel C) foram dosados por espectrofotometria (ELISA). O grupo denominado S recebeu somente salina. As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada TNF, IL-1b ou IL-10 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina como pré-tratamento (* $p < 0.05$; Turkey – ANOVA).

28. Efeito da clorpromazina na liberação de citocinas na cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan

Clorpromazina na dose que induziu o maior efeito no bloqueio da incapacitação articular (0.3 mg/kg) foi capaz de inibir em 32.6% ($p < 0.01$) a liberação de IL-1 (Figura 36, painel B) mas não a liberação de TNF, IL-10, IL-6 ou CINC-1 (Figura 36, painel A, C, D e E) para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan na mesma dose capaz de induzir incapacitação articular (1 mg/cavidade). A inibição da liberação de TNF- α por clorpromazina foi constatada pela dosagem das mesmas nos sobrenadantes de lavado articular obtidos de animais previamente tratados com clorpromazina e estimulados com zymosan. Para tal utilizou-se imunoenaios específicos para cada citocina já descritos anteriormente.

29. Efeito do tratamento clorpromazina na produção do fator de necrose tumoral por células residentes da pele da pata de rato estimuladas com carragenina demonstrado por reação imunohistoquímica.

Clorpromazina (1 mg/kg) foi administrada previamente a carragenina (100 μ g/pata) , dose em que demonstrou antinocicepção máxima no teste da hiperalgesia mecânica em pata de rato. Os protocolos de tratamento e indução foram os mesmos utilizados na hiperalgesia mecânica. Foi observado que carragenina induziu a produção de TNF por células residentes demonstrado por uma intensa marcação por imunohistoquímica (figura 37 C). O pré-tratamento com clorpromazina diminuiu de modo discreto a marcação por imunohistoquímica (figura 37 D).

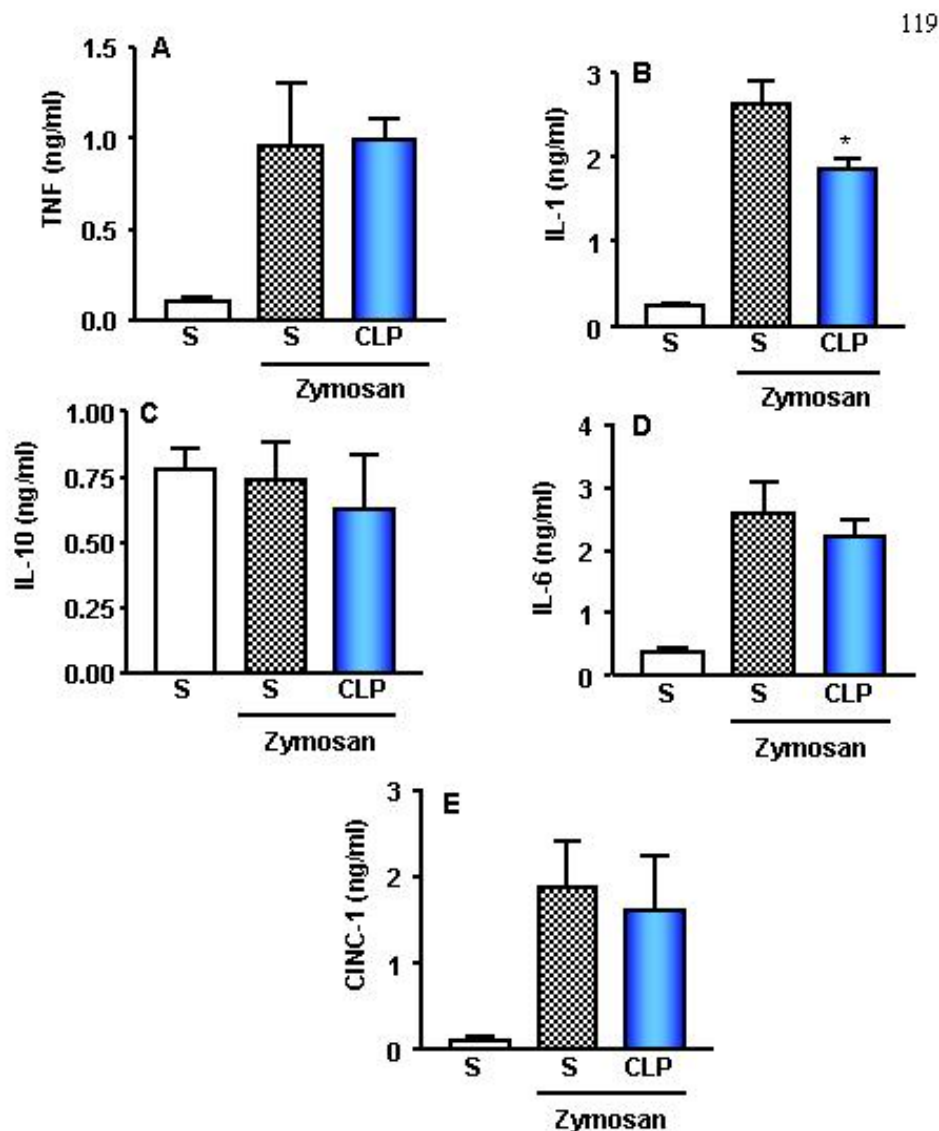


FIGURA 36. Efeito da clorpromazina sobre a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1beta (IL-1b), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6) ou CINC-1 na cavidade articular de joelho de ratos estimulados com zymosan. Zymosan (1 mg/cavidade) foi administrado intrarticular em joelho de ratos previamente tratados i.p. (30 min) com salina ou clorpromazina (0.3 mg/kg; CLP). Duas horas após a injeção do zymosan a cavidade articular foi lavada e no sobrenadante obtido foram dosados os níveis de TNF (painel A), IL-1 β (painel B), IL-10 (painel C), IL-6 (painel D) ou CINC-1 (painel E) por espectrofotometria (ELISA). O grupo denominado S recebeu somente salina. As barras representam as médias \pm EPM da quantidade dosada TNF, IL-1 β , IL-10, IL-6 ou CINC-1 de quatro animais por grupo. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu salina como pré-tratamento (* $p < 0.01$; Turkey – ANOVA).

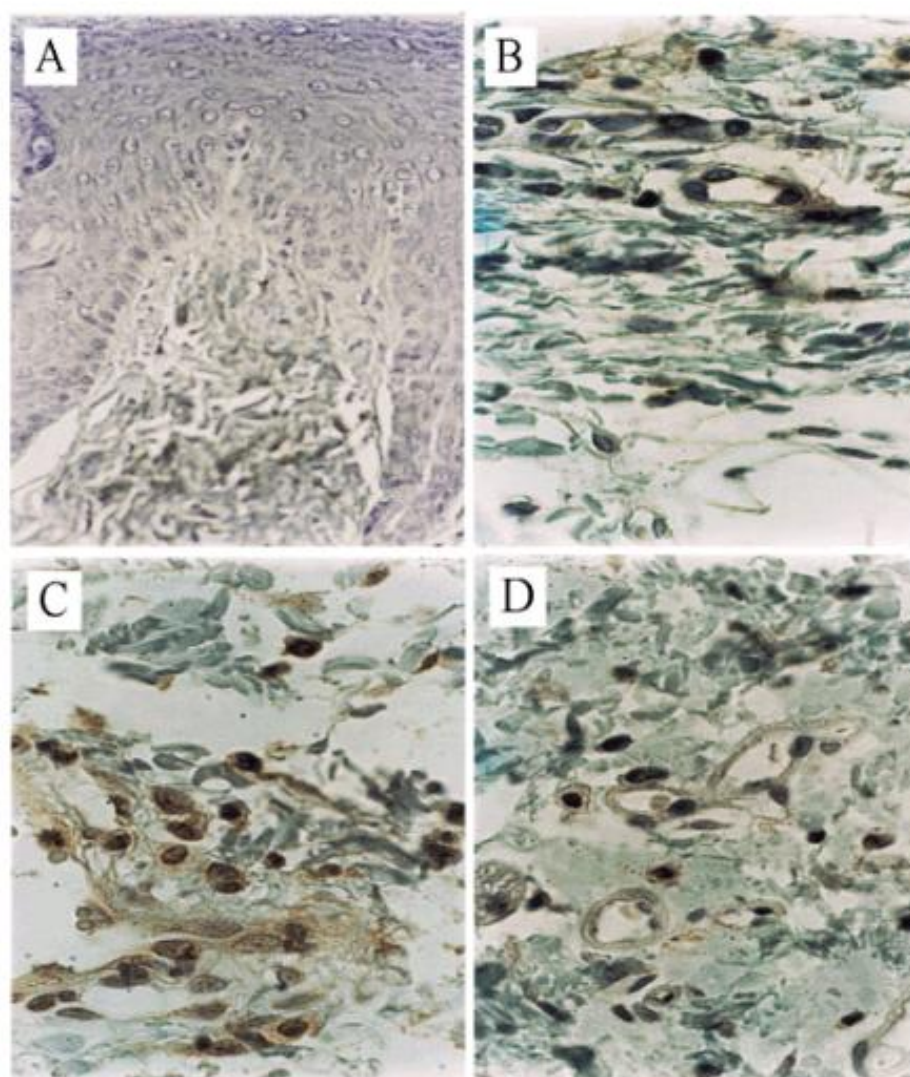


FIGURA 37. Tratamento com clorpromazina reduz a produção do fator de necrose tumoral demonstrado por reação imunohistoquímica em pele de pata de rato estimulada com carragenina. A: Controle negativo da marcação por imunohistoquímica para TNF de pata de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina; ausência do anticorpo primário anti-TNF de rato. B: Ausência de marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata tratada somente com salina. C: Intensa marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de animal pré-tratado com salina (i.p.) e estimulados com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.). D: Diminuição da marcação por imunohistoquímica para TNF em células inflamatórias de pata de animal pré-tratado com clorpromazina (1 mg/kg; i.p.) e estimulado com carragenina (100 μ g/pata; i.pl.).

IV. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antinociceptiva da talidomida, pentoxifilina e clorpromazina em modelos experimentais de dor induzida por estímulos inflamatórios. Além disso, estudar as possíveis citocinas envolvidas na promoção da nocicepção induzida por diferentes estímulos assim como o efeito das drogas na modulação dessas citocinas. Dentre os modelos experimentais utilizados no trabalho o de contorções abdominais já foi extensivamente estudado e descrito na literatura e vem sendo utilizado por nosso grupo em diversos estudos. Escolhemos os estímulos ácido acético e zymosan nesse modelo, pois já estão bem estabelecidos na literatura.

Foi sugerido que o ácido acético induz nocicepção por um mecanismo indireto possivelmente por liberar substâncias endógenas que excitam as terminações nociceptivas (COLLIER *et al.*, 1968). Confirmando esses dados, em estudo anterior, demonstramos que ácido acético induz nocicepção (contorção abdominal) por agir sobre células residentes como macrófagos e mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos induzindo a liberação de mediadores inflamatórios (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Por sua vez zymosan, o polissacarídeo da parede celular do fungo *Saccharomyces Cerevisiae*, é capaz de induzir a liberação de diversos mediadores inflamatórios dentre eles: componentes do sistema complemento, prostaglandinas e leucotrienos (BONNEY *et al.*, 1978; SCOTT *et al.*, 1980; HUMES *et al.*, 1982), fator de ativação plaquetária (ROUBIN *et al.*, 1982), espécies reativas do oxigênio (NAUSEEF *et al.*, 1983) e TNF e IL-1 β (RIBEIRO *et al.*, 2000, VALE *et al.*, 2003; PETTIPHER AND SALTER, 1996). O zymosan induz extravasamento de proteínas plasmática e infiltrado de células inflamatórias, resultando numa cascata de eventos incluindo ativação do sistema do complemento, degranulação de mastócitos e geração dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (DOHERTY *et al.*, 1985; RAO *et al.*, 1994). Assim como ácido acético zymosan também induz nocicepção visceral quando injetado por via i.p. As doses utilizadas no estudo estão de acordo com publicação anterior (RIBEIRO *et al.*, 2000).

No mesmo modelo já foi demonstrado que células residentes da cavidade peritoneal de camundongos desempenham papel crucial no desenvolvimento da resposta nociceptiva do zymosan (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Como já discutido na introdução do presente estudo, a presença de macrófagos e mastócitos residentes iniciam a resposta nociceptiva e a depleção destas células, da cavidade peritoneal, inibe o desenvolvimento da nocicepção. Tais células são capazes de produzir e liberar diversos mediadores dentre estes as citocinas.

Citocinas como TNF age como iniciador da cascata de mediadores responsáveis pela gênese da dor inflamatória assunto bem discutido e estabelecido na literatura. A liberação de TNF e IL-1 por células residentes peritoneais murinas estimuladas, *in vivo*, com zymosan já foi demonstrada em trabalho recente (VALE *et al.*, 2003), assim como também que a inibição da gênese dessas citocinas está associada à inibição da nocicepção, pois anticorpos específicos para essas citocinas foram capazes de diminuir o número de contorções abdominais induzidas tanto por ácido acético como por zymosan (RIBEIRO *et al.*, 2000). As drogas estudadas no presente trabalho são moduladoras da produção de tais citocinas e esse fato nos levou a estudar uma possível atividade antinociceptiva neste modelo experimental.

Os outros testes nociceptivos utilizados também já estão bem estabelecidos na literatura. A incapacitação articular em joelho de rato é um modelo experimental fácil e objetivo que permite o estudo de drogas analgésicas periféricas e de efeito central (TONUSSI & FERREIRA, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 1999). Ademais, a cavidade articular permite a avaliação de parâmetros inflamatórios através da coleta do exsudato articular para a avaliação da migração leucocitária e dosagem de mediadores liberados diretamente no local da inflamação.

No presente trabalho o exsudato articular foi utilizado para dosagem de citocinas, mas não para avaliar migração celular, pois em estudo anterior (VALE, 2000) não parece haver correlação entre o aumento do número de leucócitos e nocicepção. Ainda no mesmo modelo ROCHA e colaboradores demonstraram que a injeção de zymosan em articulações intactas induz uma periartrite a qual é responsável pelo fenômeno da incapacitação articular, diferente de quando o zymosan é injetado diretamente na sinóvia através de um acesso cirúrgico o qual não promove incapacitação articular (ROCHA *et al.*, 1999). Esses achados estão de acordo com a literatura, onde já foi demonstrado que a membrana sinovial possui poucos nociceptores onde a

maioria deles participam da função vascular autônoma (HASSELBACHER *et al.*, 1981), ao contrário da inervação da cápsula fibrosa, ligamento articular e periósteo, estruturas ricamente inervadas por fibras simpáticas e somáticas (KENNEDY *et al.*, 1982; GRÖNBLAD *et al.*, 1985). Foi sugerido que além da presença de mediadores liberados no local, a estrutura peri-articular é importante, tornando o local da injeção da substância algio gênica crucial para o desenvolvimento da incapacitação articular.

Assim como no teste de contorções abdominais, o papel de TNF no modelo de incapacitação articular foi anteriormente demonstrado, porém, utilizando carragenina como estímulo (TONUSSI e FERREIRA *et al.*, 1999). Neste estudo observou-se que o anticorpo para TNF inibiu a incapacitação articular induzida por carragenina. No entanto, quando o próprio TNF foi utilizado como estímulo em articulações *naive*, não induziu incapacitação articular, mas sim em articulações previamente estimuladas (72 h) com carragenina alcançando efeito máximo já na primeira hora e permanecendo por várias horas. Os autores sugerem que alguns eventos prévios à liberação de TNF sensibilizam a articulação para o efeito da citocina. Uma hipótese seria a liberação prévia de bradicinina ao TNF, pois antagonistas da cinina administrados previamente à carragenina inibem a incapacitação assim como o antagonista do receptor B1 da bradicinina inibe parcialmente a incapacitação evocada por TNF, indicando que TNF também deve induzir a liberação de bradicinina (TONUSSI e FERREIRA *et al.*, 1999).

Na artrite experimental por zymosan, onde o mesmo é injetado na cavidade articular de ratos, também já foi demonstrado por dosagem de citocina que há produção local de TNF na cavidade articular atingindo concentrações máximas em 1 a 2 horas após a indução (PETTIPHER AND SALTER, 1996). Assim, observamos que o modelo de incapacitação articular induzida por zymosan seria de valia para o estudo da possível atividade antinociceptiva de talidomida, pentoxifilina e clorpromazina, na dor articular por nocicepção, drogas que dentre outras atividades são moduladoras da síntese de citocinas. Ademais diversos autores comentam a importância das citocinas pró-inflamatórias na gênese das doenças articulares, onde a dor é um fator limitante, demonstrando que as terapias mais promissoras neste sentido seriam

as direcionadas para o bloqueio da gênese dessas citocinas principalmente a nível local (MORELAND, 1999; REIMOLD, 2002).

A hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-Selitto modificado por FERREIRA *et al.*, 1989) é um método subjetivo que exige treinamento prévio do observador mas que tem a vantagem da homogeneidade entre as amostras e é bastante fidedigno. Utilizamos tal modelo para que outros estímulos pudessem ser avaliados e pudessem servir de ferramentas farmacológicas. Como já comentado na introdução deste estudo, no teste de hiperalgesia mecânica em pata de rato foi demonstrado o papel modulador de citocinas sobre a hiperalgesia induzida por diversos estímulos e é um método que permite avaliar o efeito central ou periférico de drogas analgésicas, bem como a ação local ou sistêmica das mesmas.

Os dados do presente trabalho demonstram que talidomida inibe de modo significativo e dose-dependente as contorções abdominais induzidas tanto por ácido acético como por zymosan. As doses utilizadas partiram de informações retiradas da literatura. Da dose sugerida foi feita uma curva dose-resposta para obter a dose antinociceptiva ideal. A dose de maior efeito antinociceptivo foi a de 45 mg/kg que alcançou até 85,6% de inibição. O bloqueio da produção de TNF pode explicar o efeito antinociceptivo da talidomida neste modelo. Confirmando essa sugestão, nossos dados demonstram que o tratamento com talidomida reduziu os níveis de RNAm nas células peritoneais residentes colhidas de camundongos injetados com zymosan. Essa redução dos níveis de RNAm para TNF está de acordo com a demonstração de que o mecanismo pelo qual talidomida inibe a produção de TNF é devido a sua habilidade de aumentar a degradação do RNAm para TNF (MOREIRA *et al.*, 1993).

Diante de dados da literatura que descrevem uma seletividade de talidomida pela inibição de TNF e de outros dados que descrevem uma não seletividade desta droga, procurou-se investigar a atividade da talidomida sobre a produção de citocinas por células residentes da cavidade peritoneal. Para isso as células foram colhidas e postas em cultura por 12 horas e no sobrenadante da cultura foram dosados os níveis das citocinas murinas TNF, IL-1 β , IL-10 e IL-4 por ensaio imunoenzimático. É importante salientar que as células residentes que foram postas em cultura foram estimuladas *in vivo*, isto

é, procuramos reproduzir o protocolo utilizado para o tratamento e indução das contorções abdominais segundo o modelo descrito anteriormente e só após tais procedimentos as células foram colhidas e postas em cultura. Este protocolo também serviu para a realização do RT-PCR para avaliar os níveis de RNAm para TNF. Os níveis de citocinas não foram dosados diretamente no exsudato colhido pra evitar resultados falsos positivo/negativo, devido ao clearance elevado observado na cavidade peritoneal.

Os dados mostram que zymosan induz um aumento significativo dos níveis de TNF e IL-1 β no sobrenadante de cultura quando comparado ao grupo de animais que recebeu somente salina como tratamento (naive) e que o grupo pré-tratado com talidomida 45mg/kg obteve valores semelhantes ao grupo salina. Talidomida, portanto neste modelo exerceu uma atividade inibitória sobre a liberação de TNF, observou-se uma inibição de 100% dos níveis desta citocina. O mesmo não foi observado com a dosagem dos níveis de IL-1 β no mesmo sobrenadante. Zymosan foi capaz de induzir de maneira significativa a liberação de IL-1 β quando comparado ao grupo salina, mas talidomida não inibiu tal efeito. Estes dados estão de acordo com outro estudo que descreve a inibição da produção de TNF por talidomida em monócitos humanos estimulados com LPS sem, no entanto, influenciar a síntese protéica geral ou a síntese de IL-1, IL-6 e GM-CSF (SAMPAIO *et al.*, 1991). Esses dados talvez demonstrem também que na cavidade peritoneal de camundongos a produção de IL-1 induzida por zymosan não segue exatamente o modelo de cascata de citocinas observada em outros modelos, visto que talidomida inibe TNF, mas a produção de IL-1 continua aumentada. Corroborando com este resultado estão dados nossos anteriores que mostram que o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF reduz o numero de contorções abdominais apenas pela metade (Ribeiro *et al.*, 2000)

Dados de outros autores, publicados anteriormente, demonstram uma controversa indução da produção de IL-10 e IL-4 por talidomida, onde é sugerido, em alguns estudos, que talidomida induz a produção dessas duas citocinas e há outros sugerindo que talidomida não age sobre IL-4 e IL-10 (McHUGH *et al.*, 1995; ROWLAND *et al.*, 1998; GEORGE *et al.*, 2000, MOREIRA *et al.*, 1997). O fato de talidomida induzir ou não a produção de IL-4

ou IL-10 é relevante na presente investigação visto que já demonstramos o importante papel dessas citocinas no controle da dor inflamatória e que as mesmas quando administradas previamente ao estímulo inflamatório são capazes de inibir a resposta nociceptiva em animais experimentais (VALE *et al.*, 2000). Os resultados do presente trabalho com a dosagem dos níveis de IL-10, no sobrenadante de cultura de macrófagos, demonstram que talidomida não exerceu efeito algum sobre os níveis desta citocina quando comparado ao grupo não tratado (controle positivo). Entretanto não podemos afirmar que talidomida não tenha efeito sobre a citocina em camundongos, pois este fato pode estar relacionado com o tempo em que as amostras foram coletadas ou talvez com fatores endógenos que são excluídos no momento em que as células são postas em cultura. De fato, outros autores utilizando um modelo de dor crônica observaram que o aumento dos níveis de IL-10 induzidos por talidomida só foram significativos após 2 dias da administração da droga (SOMMER *et al.*, 1998). Mesmo assim podemos sugerir que talidomida no tempo e dose aqui utilizados tem efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzido por zymosan por um mecanismo independente da modulação da produção de IL-10.

É interessante observar que o grupo que não recebeu estímulo inflamatório apresentou níveis de IL-10 semelhantes ao grupo controle, indicando, talvez, que essa citocina possa ser constantemente produzida por células peritoneais residentes. Na verdade, em publicação anterior já havíamos demonstrado que quando suprimimos a IL-10 endógena através do pré-tratamento com anticorpo específico para esta citocina observamos que há uma exacerbação da nocicepção induzida por zymosan, sugerindo então um papel protetor ou modulatório negativo sobre o efeito do zymosan. Os mesmos procedimentos também foram feitos para avaliar os níveis de IL-4, no entanto não foi possível detectá-lo, no ensaio talvez por níveis muito baixos desta citocina (dados não mostrados).

Os resultado acima podem ser confirmados pelo fato de que o pré-tratamento de ratos, submetidos à hiperalgesia plantar induzida por carragenina, com os anticorpos anti-IL-10 e anti IL-4 não reverteu o efeito antinociceptivo da talidomida. Estes dado sugerem que o efeito antinociceptivo

da talidomida neste modelo parece não depender da indução dessas duas citocinas.

No modelo de incapacitação articular em joelho de rato o tratamento com zymosan induziu nocicepção avaliada como sendo o tempo de suspensão da pata em segundos quando os ratos são colocados no aparelho para medir incapacitação articular descrito anteriormente em materiais e métodos. A dose de 1 mg/animal foi escolhida baseado em dados anteriores (ROCHA *et al.*, 1999; VALE, 2000) que mostram que essa dose induz artrite e apresenta efeito máximo nociceptivo no modelo descrito. Como o aparelho mede o tempo que cada animal permanece com a pata direita suspensa durante 1 min, todos os animais foram testados antes da injeção da substância algio gênica (tempo zero) para determinar esse tempo em uma deambulação normal. Os resultados são mostrados em forma de delta (Δ) onde o valor de cada medida é subtraído do tempo zero, ficando assim mais nítido o real tempo de incapacitação.

Nossos resultados mostram que talidomida, quando administrada sistemicamente antes da substância nociceptiva, inibe incapacitação articular induzida por zymosan de maneira dose-dependente. Observou-se a inibição principalmente na 3^a e 4^a horas após a injeção da substância nociceptiva. O pico de incapacitação articular apresentado pelos animais pode variar entre a 3^a e 4^a horas e nesse experimento o pico se apresentou na 4^a hora, entretanto não houve diferenças estatísticas quando foram comparados os dois tempos no grupo controle (teste T de student). Das doses utilizadas a de 45 mg/kg foi a mais eficaz em inibir o efeito nociceptivo do zymosan, alcançando 89% de inibição na 3^a hora de incapacitação.

Com base nestes resultados a dose de 45mg/kg foi utilizada para investigar o efeito da talidomida na produção de citocinas na cavidade articular dentre elas: TNF, IL-1, IL-10, IL-6 e CINC-1. Para isso os animais foram pré-tratados com talidomida e foi induzida artrite por zymosan seguindo o mesmo protocolo visto para o teste de incapacitação articular. Nossos dados mostram que zymosan é capaz de induzir a liberação de TNF, IL-1, IL-6 e CINC-1 no lavado articular e que talidomida inibe a produção de TNF de modo significativo, mas não a das outras citocinas. Vale ressaltar que CINC-1 (quimioatraente para neutrófilos induzido por citocina) é uma quimiocina que medeia funções da IL-8 no rato, visto que ratos não produzem IL-8 (GUEx-

CROSIER *et al.*, 1996; YOSHIDA *et al.*, 1998). Ademais IL-8 e CINC-1 compartilham o mesmo receptor para quimiocinas CXCR2 (WUYTS *et al.*, 1999; SHIBATA *et al.*, 2000). Também observamos a presença de IL-10 no lavado articular dos animais não estimulados em níveis semelhantes ao grupo controle (tratados com zymosan) e mais uma vez talidomida não alterou os níveis de IL-10 de modo significativo. De posse desses resultados podemos sugerir que atividade antinociceptiva da talidomida na nocicepção articular induzida por zymosan está associada à sua atividade inibitória sobre a produção de TNF na cavidade articular.

A produção de TNF por zymosan parece não depender de células que migram para o local da inflamação, pois a imunohistoquímica para detecção de TNF feita nas células colhidas do lavado articular não demonstrou marcação para TNF (dados não mostrados). Estes resultados corroboram com dados prévios da literatura que descrevem que a indução da produção de TNF por zymosan não depende de neutrófilos e monócitos que migram para a cavidade articular, mas possivelmente deve-se sinoviócitos do tipo A residentes da sinóvia (PETTIPHER and SALTER, 1996).

No teste de hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randall-Selitto modificado) induzido por carragenina a talidomida demonstrou atividade anti-hiperalgésica dose-dependente, quando administrada previamente ao estímulo, sendo a dose de 45 mg/kg a de maior efeito, semelhante ao que foi observado nos dois modelos anteriores. Paralelo a isso foi avaliado o seu efeito sobre o edema de pata induzido por carragenina. No entanto talidomida não demonstrou efeito anti-edematogênico nas doses em que inibiu a hiperalgesia. Está descrito que TNF, IL-1 ou IL-8, em doses que causam hiperalgesia não induzem edema (POOLE *et al.*, 1999a). Supomos que no presente modelo os eventos iniciais que sucedem a injeção de carragenina incluem a formação de cininas causando aumento da permeabilidade vascular por liberação de prostaciclina pelo endotélio potenciando as ações diretas das cininas sobre a vasculatura. Por outro lado a sensibilização de neurônios aferentes primários por eicosanoide e aminas simpatomiméticas depende da liberação de citocinas por outras células residentes via estímulo inflamatório ou bradicinina (FERREIRA *et al.*, 1993; POOLE *et al.*, 1999a e b).

Talidomida parece agir na cascata de mediadores hiperalgésicos por inibir a síntese de TNF, pois além de inibir a hiperalgesia induzida por carragenina também inibiu a hiperalgesia induzida por bradicinina, mas não teve efeito sobre a hiperalgesia induzida por TNF ou prostaglandina E₂. Assim podemos supor que o seu efeito sobre carragenina e bradicinina seja devido à prevenção da liberação de TNF, não tendo efeito quando a hiperalgesia é induzida pela própria citocina ou por mediadores finais como é o caso da prostaglandina, que é sabidamente dependente da indução por TNF da cascata de citocinas (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993). O fato de talidomida não ter demonstrado efeito anti-hiperalgésico quando administrada 1h após a carragenina está de acordo com a liberação prévia de TNF ao surgimento da hiperalgesia, além de demonstrar que talidomida não inibe a liberação de IL-1, citocina que só é detectada 2 h pós a indução por carragenina (CUNHA, 2000). Outro dado da literatura que suporta essa sugestão é a demonstração de que o tratamento com talidomida diminui a imunorreatividade endoneural ao TNF, causada por injúria por constrição crônica em secções do nervo ciático de rato (SOMMER *et al.*, 1998). A redução de imunorreatividade ao TNF está correlacionada à redução da dor por constrição do nervo ciático (SOMMER *et al.*, 1998).

Para investigar a possibilidade de talidomida estar induzindo a liberação de opióides endógenos ou agindo em receptores opióides resolvemos verificar o efeito do pré-tratamento com naloxona (antagonista de receptor opioide não específico, mas preferencial para o tipo μ) no efeito antinociceptivo da talidomida no modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético. Foi observado que naloxona não reverteu o efeito da talidomida na mesma dose em que foi capaz de reverter completamente o efeito analgésico da morfina. Embora não tenhamos usado antagonistas específicos para cada tipo de receptor, sugerimos que talidomida, neste modelo, parece estar agindo por um mecanismo que possivelmente não envolve a liberação de opióides endógenos.

Em adição para avaliar um possível componente central do efeito antinociceptivo talidomida, o teste da placa quente foi utilizado. Este modelo lança mão do estímulo térmico para provocar nocicepção fisiológica e é útil para testar drogas analgésicas de efeito central. Enquanto morfina causou um

significativo aumento do tempo de reação na placa quente, talidomida, à semelhança de indometacina, não teve efeito em tal modelo sugerindo que na dose de 45 mg/kg talidomida parece não demonstrar analgesia central.

Um protocolo experimental semelhante ao seguido para induzir hiperalgesia foi feito em animais pré-tratados ou não com talidomida na mesma dose em que foi capaz de inibir a hiperalgesia no modelo experimental por nos utilizado. Assim poderíamos avaliar o tecido plantar das patas injetadas por imunohistoquímica para detectar a presença de TNF. Nosso objetivo era verificar quais células estavam produzindo tal citocina e se a talidomida estaria inibindo essa produção. Os dados mostram que células residentes do tecido conjuntivo principalmente mastócitos e macrófagos são as principais células envolvidas na produção de TNF, pois apresentaram intensa marcação nas lâminas avaliadas. O pré-tratamento com talidomida reduziu visivelmente a marcação nos mesmos tipos celulares. O presente resultado somando-se aos anteriores sugere que carragenina quando injetada por via intraplantar promove a produção e liberação de TNF por células residentes do tecido conjuntivo e que talidomida previne a produção desta citocina sendo esse possivelmente o mecanismo pelo qual promove antinocicepção neste modelo experimental.

Pentoxifilina tem atraído interesses devido ao seu efeito imunomodulatório, principalmente sobre citocinas que causam inflamação e dor, como também pelo fato da baixa incidência de efeitos tóxicos adversos relacionados a essa droga. Tendo em vista que por possuir estas propriedades imunomodulatórias a pentoxifilina poderia também exercer atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor que envolvem o sistema imune, como a geração de citocinas por estímulos inflamatórios, o que nos motivou a estudar a atividade dessa droga nos modelos descritos anteriormente assim como sugerir um mecanismo através do qual ela exerce esse efeito, além de constatar que o assunto até a presente data ainda não foi discutido na literatura.

Inicialmente, utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e zymosan, procuramos avaliar um possível efeito antinociceptivo da pentoxifilina. Uma curva dose resposta foi realizada e observamos que o efeito antinociceptivo no modelo era significativo e dose dependente e que pentoxifilina na dose de 1.6 mg/kg foi capaz de inibir até

89.8% das contorções abdominais. No entanto quando aumentamos a dose o efeito parece diminuir, chegando a se anular quando dose chega a 45 mg/kg.

Tentando entender tal efeito encontramos respaldo na literatura e inclusive em dados nossos já publicados. Pentoxifilina, como já comentado na introdução do presente trabalho, é inibidor inespecífico de fosfodiesterases do AMPc. A inibição desse tipo de fosfodiesterase promove o aumento da concentração intracelular de AMPc gerado pela adenil ciclase. Diversos estudos relatam que o efeito modulatório da pentoxifilina sobre a rede de citocinas é possivelmente devido à capacidade de elevar o nível de AMPc intracelular. Por meio desse mecanismo é capaz de reduzir também a atividade fagocítica, produção do íon superóxido, e a liberação de enzima lisossomial por polimorfonucleares (BESSLER *et al.*, 1986). Outros autores apontam que o aumento da concentração intracelular de AMPc inibe a síntese de TNF, *in vitro* (TANNENBAUM e HAMILTON, 1989; TAFFET *et al.*, 1989), do mesmo modo que outros agentes que aumentam a concentração intracelular de AMPc (como o dibutilil AMPc e a toxina da cólera) também demonstraram atividade inibitória sobre a transcrição do gene do TNF e acúmulo de proteína (TANNENBAUM e HAMILTON, 1989).

Dados nossos anteriores demonstram um papel dual do AMPc nas contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan (BRITO *et al.*, 2001), onde pequenas doses de dibutilil AMPc (db-AMPc; análogo estável do AMPc capaz de atravessar membranas) mostram-se antinociceptivas e doses mais elevadas são pró-nociceptivas. Neste estudo foi proposto que o aumento da concentração intracelular de AMPc, mimetizado pela administração das doses menores de db-AMPc, inibiria a liberação de mediadores por células residentes, o que está amparado por outros dados da literatura (RENZ *et al.*, 1988; MARONE *et al.*, 1987, KAST *et al.*, 2000). Da mesma forma atuariam outras substâncias que agem aumentando o AMPc intracelular (forskolin, toxina da cólera e aminofilina). Além do seu efeito inibitório sobre células residentes, foi proposto que db-AMPc, em concentrações mais elevadas, diminui o limiar de ativação dos terminais nervosos nociceptivos (BRITO *et al.*, 2001) por mecanismos conhecidos e já estudados (MIZUMURA *et al.*, 1993; FERREIRA and NAKAMURA, 1979a; CUNHA *et al.*, 1999, TAIWO and LEVINE, 1991).

Nossos resultados estão de acordo com o que está proposto na literatura, pois pentoxifilina inibe a nocicepção em baixas doses e não possui efeito quando administrada em doses mais altas no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0.6%) ou zymosan (1 mg/animal). Para verificar se PTX na maior dose tinha mesmo efeito nulo ou se aumentava o número de contorções resolvemos baixar a dose de zymosan para observar alguma amplificação, visto que vínhamos utilizamos a dose de zymosan de efeito máximo. Foi constatado um efeito amplificador significativo de PTX sobre as contorções abdominais induzidas por tal estímulo. Em adição procuramos investigar se tal efeito amplificador da PTX estaria presente diante de um estímulo com mecanismo diferente dos anteriores. Utilizando um análogo estável de prostaciclina (iloprost), que sabidamente não induz contorções abdominais via estimulação de células residentes (RIBEIRO *et al.*, 2000), observamos que PTX na dose de 45 mg/kg amplifica o efeito nociceptivo do iloprost enquanto que a dose de 1.6 mg/kg não modifica a resposta desse estímulo nociceptivo.

Assim podemos sugerir que: (1) possivelmente o efeito anti-nociceptivo e pró-nociceptivo de PTX nesse modelo seja semelhante ao do dibutilil-AMPC anteriormente comentado; e que (2) em doses menores, PTX possui atividade antinociceptiva nesse modelo provavelmente por agir sobre células residentes da cavidade peritoneal, visto que na presença de zymosan ou ácido acético (estímulos que atuam via células residentes) PTX é inibitória, enquanto que quando iloprost (estímulo nociceptivo não dependente de células residentes) foi administrado como estímulo, PTX teve efeito nulo. Ademais, para afastar a possibilidade de PTX estar atuando como irritante da cavidade peritoneal, e por essa razão estar causando hiper-nocicepção, testamos o seu efeito por outra via de administração (subcutânea), e não observamos diferenças significativas quando comparada ao grupo i.p. (dados não mostrado). Também não observamos efeito diferente quando combinada com naloxona, o antagonista não específico de receptores opióides, indicando que possivelmente neste modelo o seu efeito antinociceptivo não depende da liberação de opióides endógenos.

Considerando o fato de PTX exercer inibição sobre a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e após constatar um efeito antinociceptivo

(nas doses baixas) no teste de contorções abdominais, procuramos observar o seu comportamento sobre a produção de citocinas por células peritoneais residentes utilizando o mesmo raciocínio descrito antes para talidomida. Foi observado que pentoxifilina inibiu, de modo significativo, a produção de TNF e IL-1 β nas doses crescentes à partir de 1.6 mg/kg, sugerindo que o seu efeito antinociceptivo pode estar relacionado à inibição de tais citocinas. PTX, mesmo na dose alta que provoca aumento da resposta nociceptiva, inibe francamente a produção de IL-1 e TNF. Sugerimos que este efeito amplificador da PTX sobre a nocicepção possivelmente seja devido ao aumento de AMPc em terminais nervosos nociceptivos semelhante ao mecanismo de ação da prostaglandina E₂ demonstrado por FERREIRA e NAKAMURA (1979a).

Em adição, à semelhança do que observamos com a talidomida, PTX também não modula a produção de IL-10 por células residentes peritoneais, pelo menos no período observado no presente trabalho, apesar de alguns autores descreverem ações modulatórias de PTX sobre a produção de IL-10, que parecem depender do estímulo utilizado (FUJIMOTO *et al.*, 1999; VAN FURTH *et al.*, 1997; D'HELLENCOURT *et al.*, 1996). Nossos resultados estão de acordo com outros autores (SAMPAIO *et al.*, 1998).

No modelo de incapacitação articular induzido por zymosan o pré-tratamento com PTX produziu efeito antinociceptivo significativo, quando comparado ao grupo controle, principalmente na 2^a e 3^a horas após a injeção da substância algio gênica. A dose de 1.6 mg/kg foi a que causou efeito máximo de inibição à semelhança do que foi visto no outro teste nociceptivo. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos pré-tratados com PTX. O que observamos é que PTX tende a ser menos eficaz em inibir a incapacitação articular na maior dose, entretanto não observamos diferenças estatísticas significativas entre esse grupo e o grupo que recebeu PTX 1.6 mg/kg como pré-tratamento.

Ao pesquisar o efeito do pré-tratamento com PTX sobre a produção de citocinas na cavidade articular observamos que houve uma diminuição significativa dos níveis de TNF e IL-1 no lavado articular e tendeu a inibir IL-6, mas o dado é estatisticamente não significativo. PTX também não exerceu efeito modulatório sobre a produção de CINC-1 ou IL-10 no lavado articular.

A partir dos dados acima expostos podemos observar que PTX possui atividade antinociceptiva neste modelo de dor articular e que provavelmente o fato deve-se a sua atividade inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1.

A atividade de PTX também foi estudada no modelo de hiperalgesia. Observamos resultados diferentes dos obtidos nos modelos anteriores. PTX quando administrada por via i.p. previamente à carragenina não inibiu de modo significativo a hiperalgesia nas doses de maior efeito (1.6 e 5 mg/kg) em que foi capaz de inibir a nocicepção nos testes comentados anteriormente. PTX alcançou níveis de inibição significativos somente quando a dose foi aumentada para 15 e 45 mg/kg. A dose de 100 mg/kg também foi testada, mas não foi diferente das demais (dados não mostrados). Todavia o efeito de PTX quando administrada no local, ou seja, por via intraplantar, produziu melhores resultados no que diz respeito ao seu potencial anti-nociceptivo, chegando a alcançar 73.3% de inibição na dose de 9 mg/pata.

Pentoxifilina também parece modular a cascata de citocinas hiperalgésicas, pois mostrou atividade inibitória significativa sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina e, em adição, também inibiu o efeito hiperalgésico do TNF, mas não o da IL-1 e PGE₂, sugerindo uma atividade não seletiva sobre a produção de citocinas. Possivelmente PTX age inibindo não apenas produção de TNF, mas também de IL-1, citocina supostamente liberada após o surgimento de TNF neste modelo (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1993; WATKINS *et al.*, 1995). Relacionado a tal dado está a observação de que mesmo quando administrada 1 hora após o estímulo, PTX local demonstra efeito anti-hiperalgésico, sugerindo que dessa forma PTX ainda seria capaz de inibir a liberação de IL-1 β . Está descrito que a carragenina intraplantar induz a liberação de TNF e IL-1 em tempos diferentes. Foram dosados os níveis de TNF e IL-1 em patas de ratos estimuladas com carragenina e foi observado que somente após 2 horas aparecem quantidades significativas de IL-1 (CUNHA, 2000). Contudo PTX não inibe a hiperalgesia induzida por carragenina quando injetada como pós-tratamento 2 horas depois, sugerindo que os eventos que ocorrem após a liberação de TNF e IL-1 β não são inibidos por PTX.

A pentoxifilina também foi avaliada no teste da placa quente para pesquisar a possibilidade de um sítio central de ação. Não observamos efeito significativo no tempo de reação quando comparado ao grupo salina. Somado a esse fato está a observação de que o pré-tratamento local com PTX não influencia na hiperalgesia induzida por carragenina na pata contralateral e nem altera o tempo de reação no mesmo modelo experimental quando administrada em patas não estimuladas (dados não mostrados).

Ao avaliar a marcação por imunohistoquímica para TNF observamos uma acentuada diminuição da marcação nas células inflamatórias do tecido retirado de patas pré-tratadas com PTX quando comparado visualmente com o grupo pré-tratado com salina. Este dado somando se aos demais sugerem um efeito ant-hiperalgésico da PTX no presente modelo que possivelmente está associado a sua atividade inibitória sobre a produção de citocinas principalmente TNF e IL-1 β .

Diante dos resultados acima observados é válido discutir que zymosan e ácido acético induzem contorções abdominais pouco tempo após a sua administração (5 a 10 min após) e que essa atividade nociceptiva é de mecanismo indireto, isto é, agem induzindo a liberação de mediadores inflamatórios que vão ativar ou diminuir o limiar de ativação dos terminais nociceptivos. Neste ponto sugerimos que possivelmente mastócitos são as células responsáveis pelo início da liberação desses mediadores, pois estas células, como comentado na introdução, possuem grânulos que contém substâncias pré-formadas inclusive TNF (ver ilustração 1.3).

Em estudo sobre a capacidade de mastócitos produzirem TNF, GORDON e GALLI em 1991 demonstraram que mastócitos murinos peritoneais liberam TNF e 5-HT após estimulação dependente de IgE atingindo o pico em aproximadamente 10 min. O TNF liberado em até 10 min parece ser pré-formado e proveniente do conteúdo dos grânulos dessas células seguindo a mesma cinética observada para 5-HT. Após essa rápida liberação de TNF pré-formado, mastócitos são capazes de produzir e liberar novas quantidades TNF em minutos. No mesmo estudo foi demonstrado que mastócitos são a maior fonte de RNAm para TNF *in vivo* (GORDON e GALLI, 1991) . Neste sentido a nocicepção induzida por ácido acético e zymosan no modelo de contorções abdominais pode ter início na degranulação de mastócitos peritoneais

residentes e ser continuada na liberação de outros mediadores dependentes da indução por TNF. A teoria de que mastócitos podem ser os responsáveis pelo início da atividade nociceptiva de ambos estímulos é respaldada pelo fato que a simples depleção dos grânulos mastocitários pelo pré-tratamento crônico com composto 48/80 é capaz de inibir em até aproximadamente 60% o número de contorções abdominais induzidas por estes estímulos contra o efeito de 80% obtido em animais depletados de células residentes totais (RIBEIRO et al., 2000).

O TNF inicialmente liberado por degranulação mastocitária poderia excitar as terminações nervosas nociceptivas como sugerido por JUNGER e SORKIN (2000). A prevenção da liberação deste mediador, pré-formado, por talidomida ou pentoxifilina, por exemplo, poderia explicar como estas drogas inibem as contorções abdominais que se iniciam poucos minutos após a injeção da substância nociceptiva. De fato, parece que pentoxifilina inibe a degranulação de mastócitos como mostram SCHMIDT-CHOUDHURY, *et al.* (1996). Neste estudo é comparado o efeito da dexametazona e da pentoxifilina sobre a degranulação de mastócitos murinos dependente de IgE, onde somente pentoxifilina tem efeito inibitório neste modelo (SCHMIDT-CHOUDHURY, *et al.*, 1996). No que diz respeito à talidomida e clorpromazina nada está descrito na literatura sobre a relação entre a inibição da degranulação de mastócitos por essas drogas. Contudo tal suposição precisa ser estudada com mais cautela, visto que, existem outras células que devem participar do fenômeno assim como outros mediadores podem estar envolvidos. Além disso, mastócitos também são capazes de produzir e liberar mediadores, após estimulação, distintos daqueles que são estocados nos grânulos.

Mastócitos também são capazes de produzir prostaglandina em poucos minutos em resposta a estímulos. Essa produção parece ter duas fases distintas a primeira que se inicia 10 a 15 min após estimulação e que é bloqueada por aspirina demonstrando ser dependente da atividade da enzima constitutiva COX e uma segunda fase (iniciada 1 hora após) que depende da expressão de COX induzida a qual é bloqueada por dexametazona (KAWATA *et al.*, 1995). Essas observações talvez possam servir de base hipotética de como indometacina exerce atividade antinociceptiva no modelo de contorções

abdominais induzidas por ácido acético e zymosan indicando que eicosanóides devem participar da resposta nociceptiva de ambos estímulos provavelmente agindo como mediadores liberados após o TNF. Isto colabora com a idéia de que a indução da nova síntese de TNF por mastócitos (não originária dos grânulos) ou por macrófagos também colabora na indução de contorções abdominais.

O mecanismo pelo qual zymosan induz nocicepção na cavidade articular e carragenina induz na pata parece ser diferente do que foi observado na cavidade peritoneal, visto que nesses dois modelos o pico de atividade nociceptiva acontece na 3^a e 4^a horas após a indução. Nos modelo de incapacitação articular e hiperalgisia inflamatória é possível que mastócitos não exerçam função tão importante na nocicepção induzida por este estímulo do que no modelo de contorções abdominais, ou talvez estas células não estão presentes em quantidades suficientes para iniciar uma resposta nociceptiva de modo rápido. Outra explicação poderia ser de que na incapacitação por zymosan e hiperalgisia por carragenina a seqüência de liberação de mediadores realmente segue a cascata proposta por CUNHA *et al.* (1992). Nos modelos que tem pico nociceptivos mais tardios as drogas por nós avaliadas possivelmente inibem a nocicepção por inibir a síntese de TNF e/ou IL-1 por células residentes

Clorpromazina, neuroléptico comumente usado em desordens psiquiátricas, e no tratamento de alguns tipos de cefaléia, foi avaliado no presente estudo quanto a sua capacidade antinociceptiva em modelos experimentais. As doses utilizadas em um experimento piloto foram retiradas da literatura por serem descritas como antiinflamatórias provavelmente por inibir a produção de TNF (DE LIMA *et al.*, 2000). Então inicialmente foram testadas as doses de 1, 3 e 9 mg de clorpromazina, entretanto observamos que as doses de 3 e 9 mg/kg além de apresentar efeito antinociceptivo também induziam sedação impossibilitando a sua utilização. A partir dessas observações resolvemos baixar a dose e assim conseguimos obter uma curva dose-resposta onde a dose de maior efeito foi a de 1 mg/kg tanto quando o estímulo utilizado foi o ácido acético como o zymosan. É válido observar que clorpromazina tem efeito antinociceptivo nesta dose sem, no entanto induzir sedação. Esse fato foi confirmado quando os animais são colocados no

aparelho para testar a incapacitação articular, onde não houve problema na deambulação normal dos animais quando esta dose foi utilizada. Clorpromazina quando administrada previamente ao iloprost tende a inibir as contorções abdominais, contudo o efeito não é estatisticamente significativo. Ademais no estudo feito com as dosagens de citocinas do sobrenadante de cultura de células peritoneais estimuladas, *in vivo*, observamos um efeito inibitório significativo, porém fraco, sobre a produção de TNF. Nesta mesma dose clorpromazina não mostrou atividade modulatória sobre as outras citocinas. Estes dados sugerem que talvez clorpromazina na maior dose além de estar atuando sobre células residentes, provavelmente por inibir a produção de TNF, também esteja atuando por um mecanismo diferente. Mecanismo este não dependente de receptores opióides ou da liberação opióides endógenos, visto que não observamos reversão do efeito antinociceptivo de clorpromazina por naloxona nas contorções abdominais induzidas por zymosan.

Escassos resultados são encontrados na literatura sobre o assunto em modelos experimentais (JAKOUBEK, 1984). Todavia, a atividade analgésica de clorpromazina já foi estudada em humanos, mas sem a discussão sobre o seu provável mecanismo de ação (ISERSON, 1983; KELLY *et al.*, 1997; MEHL-MADRONA, 1999; MERSKEY, 1997; LOGAN, 1983).

Clorpromazina também demonstrou atividade antinociceptiva dose-dependente na nocicepção articular avaliada no modelo de incapacitação articular em joelho de rato induzida por zymosan. No entanto esse efeito nos parece intrigante. Enquanto que o pré-tratamento com clorpromazina 0.3 mg/kg bloqueou em 99% a incapacitação articular, a dose de 1 mg/kg demonstrou menos de 50% de inibição, sendo este resultado confirmado pela repetição do experimento. Novos experimentos são necessários para explicar o fato.

Por ter demonstrado atividade antinociceptiva dose-dependente no modelo de incapacitação articular, nos propusemos a avaliar o efeito da dose de 0.3 mg/kg sobre a produção de citocinas na cavidade articular. Utilizando a mesma metodologia já descrita anteriormente no presente estudo, os níveis de citocinas demonstraram que esta dose de clorpromazina inibe de maneira discreta, porém significativa, a produção de IL-1 β , mas não das demais citocinas avaliadas. No entanto outros estudos demonstram que clorpromazina inibe a produção de TNF e aumenta a produção de IL-10 como no modelo

experimental de disfunção múltipla de órgãos em camundongos induzida por zymosan (JANSEN *et al.*, 1998). Neste estudo, por exemplo, são utilizadas doses de clorpromazina que variam de 4 a 16 mg/kg/dia começando o tratamento 2 dias antes da indução com zymosan. GADINA *et al.* descrevem o efeito protetor da clorpromazina na toxicidade induzida por endotoxina por inibir TNF (GADINA *et al.*, 1991) utilizando doses de 4 mg/kg. A inibição da síntese TNF cerebral e aumento da liberação de IL-10 em camundongos também utiliza doses de 4 e 3 mg/kg. IKEDA *et al.* (1997) chega a usar 10 mg/kg como dose de clorpromazina capaz de inibir totalmente a produção de TNF. Talvez clorpromazina só iniba a síntese de TNF em doses elevadas como no caso acima. O presente estudo utiliza doses que variam de 0.1 a 1mg/kg sendo 1 mg/kg dose ótima com efeito antinociceptivo sem efeito sedativo marcante. Ao aumentar a dose para 3mg/kg o efeito sedativo é tão intenso que não permite avaliar os animais quanto à nocicepção. Supomos que atividade antinociceptiva de clorpromazina, neste modelo, está em algum aspecto relacionado à inibição de citocinas, entretanto outros mecanismos possivelmente estão atuando colaborando para tal efeito.

A hiperalgesia induzida por carragenina foi inibida por clorpromazina de modo significativo e dose dependente quando administrada por via i.p., em até 68% na dose maior (1 mg/kg) em que não observou-se sedação. Quando aumentávamos a dose para 3 mg/kg observamos um efeito sedativo. Porém quando o pré –tratamento era feito por via intraplantar, observamos discreto efeito anti-hiperalgésico, todavia significativo na dose máxima (0.2 mg/pata) em que não se ressaltou um efeito sedativo. Esse efeito parece não ter sítio relevante de ação central, pelo menos nessas doses, pois em outro experimento onde é feita a administração de clorpromazina na pata contralateral à pata que recebeu carragenina não alterou o efeito hiperalgésico da carragenina. Ademais não observamos efeito importante no teste da placa quente em camundongos.

Clorpromazina inibiu de modo significativo também todos os outros estímulos utilizados no teste da hiperalgesia mecânica, porém de maneira discreta quando o estímulo era PGE₂. Não houve diferenças entre o pré-tratamento e o pós-tratamento (2 horas) com clorpromazina, além de ter observado visivelmente apenas uma inibição modesta da produção de TNF por

células inflamatórias da pata dos animais tratados com clorpromazina ilustrado pela imunohistoquímica. Sugere-se um mecanismo de ação periférico adicional ao seu efeito sobre a produção de citocinas.

Por fim, o presente estudo procurou avaliar a atividade antinociceptiva das drogas talidomida, pentoxifilina e clorpromazina, inicialmente por estas serem inibidoras da síntese de citocinas pró-inflamatórias principalmente TNF. A analgesia promovida por talidomida e pentoxifilina está de acordo com o pré-suposto, no entanto o efeito antinociceptivo de clorpromazina parece ser parcialmente dependente deste mecanismo, podendo haver outro componente influenciando nos resultados o que necessita de maiores estudos. Em adição nossos resultados alertam para a importância da dosagem utilizada para se obter analgesia adequada principalmente a respeito da PTX .

A introdução dos agentes anti-TNF (comentados na parte da introdução) na prática clínica reumatológica tem promovido alívio substancial da dor e inibição da progressão da doença (artrite reumatóide). Os dados atuais sugerem uma administração relativamente segura, no entanto alguns estudos demonstram o aumento da incidência de neoplasias e de infecções oportunistas com o uso desses agentes (FURST *et al.*, 2003). Em adição, devido a sua natureza imune, o aparecimento de anticorpos contra esses agentes, limita a longo prazo, a sua utilização, em alguns pacientes.

Pelo menos em alguns pacientes, estratégias para bloquear a produção de TNF e outras citocinas inflamatórias associadas ao uso dos chamados “agentes biológicos”, poderiam trazer benefícios na prática clínica, tanto por aumentar a sua eficácia clínica como por diminuir os seus custos. Os dados apresentados no presente estudo demonstrando que o efeito antinociceptivo da talidomida, pentoxifilina e clorpromazina em vários modelos experimentais está associado à inibição de citocinas inflamatórias (TNF e IL-1) claramente indica que estudos em seres humanos que explorem este aspecto merecem consideração.

V. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Talidomida possui potente atividade antinociceptiva demonstrada nos modelos de contorções abdominais, incapacitação articular e hiperalgesia mecânica induzida por estímulos inflamatórios. Tal atividade parece ser periférica, e está associada à inibição da produção do fator de necrose tumoral, por células residentes.
2. Pentoxifilina possui potente atividade antinociceptiva demonstrada nos modelos de contorções abdominais, incapacitação articular e hiperalgesia mecânica induzida por estímulos inflamatórios. Tal atividade é periférica e está relacionada a uma inibição da produção de citocinas principalmente o fator de necrose tumoral e a Interleucina-1beta, por células residentes do sítio da injúria.
3. Pentoxifilina dependendo da dose e do modelo experimental poderá ter efeito hiperalgésico possivelmente relacionado ao seu mecanismo amplificador sobre a concentração de AMPc.
4. Clorpromazina possui potente atividade antinociceptiva demonstrada nos modelos de contorções abdominais, incapacitação articular e hiperalgesia mecânica induzida por estímulos inflamatórios. Tal atividade é periférica, pelo menos nas doses consideradas no presente estudo, e parece dever-se parcialmente a inibição de citocinas por células residentes do local da injúria, mas outros mecanismos desconhecidos possivelmente estão envolvidos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCETTO B. Beneficial hemorheologic therapy of chronic peripheral arterial disorders with pentoxifylline: results of double-blind study versus vasodilator-nylidrin. **Am Heart J. May;103(5):864-9, 1982.**
- ADAMS D.O., HAMILTON T.A. The activated macrophage and granulomatous inflammation. **Curr Top Pathol.;79:151-67, 1989.**
- ALEGRE M.L., GASTALDELLO K., ABRAMOWICZ D., KINNAERT P., VEREERSTRAETEN P., DE PAUW L., VANDENABEELE P., MOSER M., LEO O, GOLDMAN M. Evidence that pentoxifylline reduces anti-CD3 monoclonal antibody-induced cytokine release syndrome. **Transplantation. Oct;52(4):674-9, 1991.**
- ALEY K.O., MESSING R.O., MOCHLY-ROSEN D., LEVINE J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J Neurosci. Jun 15;20(12):4680-5, 2000.**
- ALJANADI, M., ALBALLA, S., ALDALAAN, A., ANDRAZIUDDIN, S.. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus,rheumatoid arthritis,and other rheumatic diseases. **J.Clin.Immunol.13 :58 –67, 1993.**
- ANANTH J.V., MINN K. Chlorpromazine-induced systemic lupus erythematosus. **Can Med Assoc J. Mar 17;108(6):680, 1973**
- ARMSTRONG, D., DRY, R.M.L, KEELE, C.A., MARKHAM, J.W. Observations on Chemical excitants of cutaneous pain in man. **Journal of Physiology 120: 326, 1953.**
- BARNHILL, R.L., AND C. McDOUGALL.. Thalidomide: Use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions. **J. Am. Acad. Dermatol. 7: 317, 1982.**
- BAUER K., DIXON S., FIGG W. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, wich is espécies dependent. **Biochem pharmacol. 55:1827-34, 1998.**
- BELDA W., MANZOLI S., JORDY C.F. Thalidomide in the control of pain in leprotic neuritis. **Hospital (Rio J) Sep;70(3):731-7, 1966.**
- BESHAY, E., CROZE, F., PRUD'HOMME, G.J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. **Clin Immunol. Feb;98(2):272-9, 2001.**

- BESSLER H., GILGAL R., DJALDETTI M., ZAHAVI I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J Leukoc Biol. Dec;40(6):747-54**, 1986.
- BEUTLER B., MILSARK I.W., CERAMI A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science. Aug 30;229(4716):869-71**, 1985.
- BEUTLER, B., GREENWALD, D., HULMES, J.D., CHANG, M., PAN, Y.C.E., MATHISON, J., ULEVITCH, R., CERAMI, A., Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature 316**, 552–554. **143**, 168–170, 1985.
- BISSONNETTE E.Y., HOGABOAM C.M., WALLACE J.L., BEFUS A.D. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. **J Immunol. Nov 1;147(9):3060-5**, 1991.
- BOGDAN C., VODOVOTZ Y., NATHAN C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J Exp Med. Dec 1;174(6):1549-55**, 1991.
- BONNEY R.J., WIGHTMAN P.D., DAVIES P., SADOWSKI S.J., KUEHL F.A. JR, HUMES J.L.. Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages. **Biochem J. Nov 15;176(2):433-42**, 1978.
- BRESNIHAN B., ALVARO-GRACIA J.M., COBBY M., DOHERTY M., DOMLJAN Z., EMERY P., NUKI G., PAVELKA K., RAU R., ROZMAN B., WATT I., WILLIAMS B., AITCHISON R., MCCABE D., MUSIKIC P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis Rheum. Dec;41(12):2196-204**, 1998.
- BRITO, G.A.C., SARAIVA, S.N.R., FALCÃO J.L.A.A., VALE, M.L., LIMA, A.A.M., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Dual effect of cAMP on the writhing response in mice. **Eur. J. Pharmacol. 416**: 223-230, 2001.
- BROWNING J.L., NGAM-EK A., LAWTON P., DEMARINIS J., TIZARD R., CHOW E.P., HESSION C., O'BRINE-GRECO B., FOLEY S.F., WARE C.F. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a

heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. **Cell**;72:847–56, 1993.

BURD P.R., THOMPSON W.C., MAX E.E., MILLS F.C. Activated mast cells produce interleukin 13. **J Exp Med. Apr 1;181(4):1373-80**, 1995.

CALABRESE L., FLEISCHER A. Thalidomide: current and potential clinical applications. **Am J Med. , 108:487-95**, 2000.

CALLARD R.E., MATTHEWS D.J., HIBBERT L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today*. Mar;17(3):108-10, 1996.

CARSWELL, E.A., OLD, L.J., KASSEL, S.G., FIORE, N., WILLIAMSON, B.. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3666–3670**, 1975.

CERVERO, F. Visceral pain. In: Dubner R, Gebhart GF, Bond MR, eds. *Proceedings of the Vth World Congress on Pain*. Amsterdam: **Elsevier**: 216–26, 1988.

CERVERO, F. Visceral nociceptors. In: Belmonte C, Cervero F, eds. *Neurobiology of nociceptors*. Oxford: **Oxford University Press**: 220 – 40, 1996.

CERVERO F., MEYER R.A., CAMPBELL J.N. A psychophysical study of secondary hyperalgesia: evidence for increased pain to input from nociceptors. **Pain. Jul;58(1):21-8**, 1994.

CHEDID L. [Comparative action of promethazine, chlorpromazine and cortisone in mice receiving fatal doses of a bacterial endotoxin.] *C R Seances Soc Biol Fil*. 1954 Jun;148(11-12):1039-43.

COLLIER, H.O.J., DINNEEN, L.C., CHISTINE, A. JOHNSON, A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother. 32: 295**, 1968.

CONFER D.L., EATON J.W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. **Science. Sep 3;217(4563):948-50**, 1982.

CONTENT, J., DE WIT, L., POUPART, P., OPPENARKER, G., VAN DAMME, J. AND BILLIAU, A. Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. **Eur. J. Biochem. 152: 253**, 1985.

- CORRAL I.G., MULLER G.W., MOREIRA A.L., CHEN Y., WU M., STIRILING D., KAPLAN G. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alfa inhibitory activity. **Mol Med.** **2**:506-515, 1996.
- CORREA C.R., CALIXTO J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol. Sep**;110(1):193-8, 1993.
- CROWE P.D., VANARSDALE T.L., WALTER B.N., WARE C.F., HESSION C, EHRENFELS B, BROWNING JL, DIN WS, GOODWIN RG, SMITH CA. A lymphotoxin-beta-specific receptor. **Science**;264:707–10, 1994.
- CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur J Pharmacol. Sep 23**;129(1-2):65-76, 1986.
- CUNHA J.M. Papel antinociceptivo do antagonista de receptores de interleucina-1 (IL-1ra). **Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –USP** Pág. 39. 2000.
- CUNHA J.M., CUNHA F.Q., POOLE S., FERREIRA S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br J Pharmacol. Jul**;130(6):1418-24, 2000.
- CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.** **104**: 765, 1991.
- CUNHA, F.Q., MONCADA, S. AND LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **182**: 1155, 1992b.
- CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., VEIGA, F.H. & FERREIRA. S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J.Pharmacol.** **126**: 45, 1999.
- CUNHA, F.Q., POOLE, S., LOREZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor a in the development of inflammatoy hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** **107**: 660, 1992a.
- D´AMATO R., LOUGHNAN M., FLYNN ER., FOLKMAN J. thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **PNAS** **91**: 4082-5, 1991.

- DAVID J. MACEWAN. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular Consequences . **Cellular Signalling** **14** : 477– 492, 2002.
- DAVIS, A.J., PERKINS, M.N. Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacology** **33**: 127, 1994.
- DE CAMPOS D.I., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. A new mechanism of action of dipyron: blockade of the release of a nociceptive factor from macrophages. **Braz J Med Biol Res.**; **21(3)**:565-8, 1988.
- DE IONGH, R.U., A quantitative ultrastructural sensory lumbosacral nerve roots in the thalidomide-tracted rabbit fetus. **J. neuropathol. Exp. Neurol.** **49**: 564, 1990.
- DE LIMA V., BEZERRA M.M., DE MENEZES ALENCAR V.B., VIDAL F.D., DA ROCHA F.A., DE CASTRO BRITO G.A., DE ALBUQUERQUE RIBEIRO R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci. Apr**; **108(2)**:123-9, 2000.
- DE SOUZA G.E., FERREIRA S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions. Oct**; **17(1)**:97-103, 1985.
- DE TOGNI P., GOELLNER J., RUDDLE N.H., STREETER P.R., FICK A., MARIATHASAN S., SMITH S.C., CARLSON R., SHORNICK L.P., STRAUSS-SCHOENBERGER J., RUSSELL J.H, KARR R., CHAPLIN D.D. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. **Science** **264**:703–7, 1994.
- DE WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.** **174(5)**: 1209, 1991a..
- DE WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J.S., ZURAUSKI, S.M. et al. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cell. **Int. Immunol.** **7**: 1405, 1995.
- DE WAAL MALEFYT, R., HAANEN, J., SPITS, H., RONCAROLO, M.G., TE VELDE, A., FIGDOR, C., JOHSON, K., ET AL., Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via

- downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med** **174**:4, 15-24, 1991b.
- D'HELLENCOURT C.L., DIAW L., CORNILLET P., GUENOUNOU M. Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. **Int J Immunopharmacol. Dec;18(12)**:739-48, 1996.
- DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M., BERNHEIM, H.A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I.S., PALLADINO, M.A. AND JR OCONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J. Exp. Med.** **163**: 1433, 1986.
- DINARELLO, C.A., IKEJIMA, T., WARNER, S.J., et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **J. Immunol.** **139**: 1902, 1987.
- DOHERTY G.M., JENSEN J.C., ALEXANDER H.R., BURESH C.M., NORTON J.A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery. Aug;110(2)**:192-8, 1991.
- DOHERTY N.S., POUBELLE P., BORGEAT P., BEAVER T.H., WESTRICH G.L., SCHRADER N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2.
Prostaglandins. Nov;30(5):769-89, 1985.
- DRAY, A., PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci** **16**: 99, 1993.
- DUARTE I.D., DOS SANTOS I.R., LORENZETTI B.B., et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.** **217(2-3)**: 225, 1992.
- DUARTE I.D., NAKAMURA M., FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **21**: 341, 1988.
- DUBOIS E.L., TALLMAN E., WONKA R.A. Chlorpromazine-induced systemic lupus erythematosus: case report and review of the literature. **JAMA. Aug 7;221(6)**:595-6, 1972.

- DUNZENDORFER S., HEROLD M., WIEDERMANN C.J. Inducer-specific bidirectional regulation of endothelial interleukin-8 production by thalidomide. **Immunopharmacology** **43**:59-64, 1999.
- EHNINGER G., EGER K., STUHLER A., SCHULER U. Thalidomide--the need for a new clinical evaluation of an old drug. **Bone Marrow Transplant.**; **12 Suppl 3**:S26-8, 1993.
- ELLIOTT M.J, MAINI R.N., FELDMANN M., LONG-FOX A., CHARLES P., BIJL H., WOODY J.N. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. **Lancet. Oct 22;344(8930)**:1125-7, 1994.
- EXLEY A.R., COHEN J., BUURMAN W., OWEN R., HANSON G., LUMLEY J., AULAKH J.M., BODMER M., RIDDELL A., STEPHENS S., et al. Monoclonal antibody to TNF in severe septic shock. **Lancet. May 26;335(8700)**:1275-7, 1990.
- FACCIOLI L.H., SOUZA G.E., CUNHA F.Q., POOLE S., FERREIRA S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions. Jun;30(3-4)**:344-9, 1990.
- FARMER, S.G., BURCH, R.M., Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annu. Ver. Pharmacol. , Toxicol. 32**: 511, 1992.
- FERREIRA S.H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. **Ann Ist Super Sanita.**; **29(3)**:367-73, 1993.
- FERREIRA S.H. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. **Br J Clin Pharmacol. Oct;10 Suppl 2**:237S-245S. 1980.
- FERREIRA SH; LORENZETTI BB; POOLE S Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol, 110**: 1227, 1993
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat. New Biol. 240(102)**: 200,1972.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., BRISTOW, A.F. AND POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature 334**: 698-700, 1988.

- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORREA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.** **53(1)**: 39, 1978.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain** **42(3)**: 365, 1990.
- FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M.I. I- Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins** **18**:179, 1979a.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins, Aug, 18:2**, 191-200, 1979b.
- FISHER RA, TELLER E. Clinical experience with ataractic therapy in tuberculous psychiatric patients. **Dis Chest. Feb;35(2)**:134-9, 1959.
- FIGG W.D., RAJE S., BAUER K.S., TOMPKINS A., VENZON D., BERGN R. et al. Pharmacokinetics of thalidomide in elderly prostate cancer population. **J. Pharm. Sci.** **88(1)**:121-5, 1999.
- FIORENTINO, D.F., BOND, M.W.AND MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.** **170**: 2081,1989.
- FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.****147(11)**: 3815, 1991.
- FOLLENFANT, R.L., NAKAMURA, M. AND GARLAND, L.G. Sustained Hiperalgesia in rats evoked by the protein kinase inhibitor H-7. **Br. J. Pharmacol.** **99**: 289, 1990.
- FONG Y., LOWRY S.F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin Immunol Immunopathol.** **May;55(2)**:157-70, 1990.
- FUJIMOTO T., NAKAMURA T., FURUYA T., NAKANE S., SHIRABE S., KAMBARA C., HAMASAKI S., YOSHIMURA T., EGUCHI K. Relationship between the clinical efficacy of pentoxifylline treatment and elevation of serum T helper type 2 cytokine levels in patients with human T-

lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Intern Med. Sep;38(9):717-21, 1999.**

FURST, D.E., SCHIFF, M.H., FLEISCHMANN, R.M., STRAND, V., BIRBARA, C.A., COMPAGNONE, D., FISCHKOFF, S.A., CHARTASH, EK. Adalimumab, a fully human anti tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). **J. Rheumatol., Dec;30(12), 2563-71, 2003.**

GADINA M., BERTINI R., MENGOZZI M., ZANDALASINI M., MANTOVANI ^a, GHEZZI P. Protective effect of chlorpromazine on endotoxin toxicity and TNF production in glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant models of endotoxic shock. **J Exp Med. Jun 1;173(6):1305-10, 1991.**

GEBHART, G.F., SENGUPTA, J.N. On visceral nociceptors. In: Besson JM, Guilbaud G, Ollat H, eds. Peripheral neurons in nociception: physiopharmacological aspects. **Paris: John Libbey Eurotext: 23–37, 1994.**

GEHANNO P., BARRY B., DEPONDT J., GUEDON C., POIGNONEC S., LEPORT C., GORIN I. Mouth and pharyngeal hyperalgesic syndromes in AIDS **Ann Otolaryngol Chir Cervicofac;107(5):311-3, 1990.**

GEIGER, H., FINKEISTEIN, B.A. [Largactil in the treatment of tuberculosis.] *Schweiz Med Wochenschr.* **Sep 11;84(37):1063-4, 1954.**

GEORGE A., MARZINIAK M., SCHAFERS M., TOYKA K.V., SOMMER C. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain. Dec 1;88(3):267-75, 2000.**

GHEZZI P., GARATTINI S., MENNINI T., BERTINI R., DELGADO HERNANDEZ R., BENIGNI F., SACCO S., SKORUPSKA M., MENGOZZI M., LATINI R., KUROSAKI M., LOMBET A., FRADIN A., BONNET J., ROLLAND Y., BRION J.D. Mechanism of inhibition of tumor necrosis factor production by chlorpromazine and its derivatives in mice. **Eur J Pharmacol. Dec 19;317(2-3):369-76, 1996.**

- GORDON J.R., GALLI S.J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. **J Exp Med.** Jul 1;**174(1)**:103-7, 1991.
- GRONBLAD M., KORKALA O., LIESI P., KARAHARJU E. Innervation of synovial membrane and meniscus. **Acta Orthop Scand.** Dec;**56(6)**:484-6, 1985.
- GUEX-CROSIER Y., WITTEWER A.J., ROBERGE FG. Intraocular production of a cytokine (CINC) responsible for neutrophil infiltration in endotoxin induced uveitis. **Br J Ophthalmol** Jul;**80(7)**:649-53, 1996
- HART, P.H., VITTI, G.F., BURGESS, D.R., WHITTY, G.A., PICCOLI, D.S. AND HAMILTON, J.A. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** **86**: 3803,1989.
- HASSELBACHER P., MCMILLAN R.M., VATER C.A., HAHN J., HARRIS E.D JR. Stimulation of secretion of collagenase and prostaglandin E2 by synovial fibroblasts in response to crystals of monosodium urate monohydrate: a model for joint destruction in gout. **Trans Assoc Am Physicians.**;**94**:243-52, 1981.
- HERVE P., FLESCHE M., TIBERGHIE P., WIJDENES J., RACADOT E., BORDIGONI P., PLOUVIER E., STEPHAN J.L., BOURDEAU H., HOLLER E., et al. Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease. **Blood.** Jun 15;**79(12)**:3362-8, 1992.
- HESSE D.G., DAVATELIS G., FELSEN D., SENIUK S., FONG Y., TRACE K.J., MOLDAWER L., CERAMI A. AND LOWRY S.F. Cachectin/tumor necrosis factor gene expression in kupffer cells. **J. Leukocyte Biol.** **42**, 422, 1987.
- HIDAKA T., SUZUKI K., KAWAKAMI M., OKADA M., KATAHARADA K., SHINOHARA T., TAKAMIZAWA-MATSUMOTO M., OHSUZU F. Dynamic changes in cytokine levels in serum and synovial fluid following filtration leukocytapheresis therapy in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Apheresis.**;**16(2)**:74-81, 2001.

- HOPKINS, S.J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. **Ann Rheum Dis** **49(4)**: 207, 1990.
- HOWARD M., O'GARRA A., ISHIDA H., DE WAAL MALEFYT R., DE VRIES J. Biological properties of interleukin 10. **J Clin Immunol. Jul;12(4)**:239-47, 1992.
- HUIZINGA T.W., DIJKMANS B.A., VAN DER VELDE E.A., VAN DE POUW KRAAN T.C., VERWEIJ C.L., BREEDVELD F.C. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis. Nov;55(11)**:833-6, 1996.
- HUMES J.L., SADOWSKI S., GALAVAGE M., GOLDENBERG M., SUBERS E., BONNEY R.J., KUEHL F.A. Jr. Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. **J Biol Chem. Feb 25;257(4)**:1591-4, 1982
- IDRISS, H.T. and NAISMITH, J.H. TNF and the TNF receptor superfamily: structure–function relationship(s). **Microsc. Res.Tech. 50**: 184–195, 2000.
- IKEDA K., HIRANO M., ORITA A., TAKEUCHI M. Chlorpromazine inhibits concanavalin A-induced liver injury independently of cytokine modulation. **Immunol Lett. Mar;55(3)**:127-31, 1997.
- ISERSON K.V. Parenteral chlorpromazine treatment of migraine. **Ann Emerg Med. Dec;12(12)**:756-8. 1983
- ISOMAKI, P., LUUKKAINEN, R., TOIVANEN, P., PUNNONEN, J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum, 39(10)**:1693, 1996b.
- JAKOUBEK B. Analgesia induced by painful stimulation and/or anticipation of pain; different mechanisms are operating. **Physiol Bohemoslov;33(2)**:171-8, 1984
- JANSEN M.J., HENDRIKS T., KNAPEN M.F., VAN KEMPEN L.C., VAN DER MEER J.W., GORIS R.J. Chlorpromazine down-regulates tumor necrosis factor-alpha and attenuates experimental multiple organ dysfunction syndrome in mice. **Crit Care Med. Jul;26(7)**:1244-50, 1998.
- JIANG Y., GENANT H.K., WATT I., COBBY M., BRESNIHAN B., AITCHISON R., MCCABE D. A. multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor

antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. **Arthritis Rheum. May;43(5):1001-9, 2000.**

JUNGER, H., SORKIN, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. **Pain Mar;85(1-2):145-51, 2000.**

KARPPINEN J., KORHONEN T., MALMIVAARA A., PAIMELA L., KYLLONEN E., LINDGREN K.A., RANTANEN P., TERVONEN O., NIINIMAKI J., SEITSALO S., HURRI H. Tumor Necrosis Factor-alpha Monoclonal Antibody, Infliximab, Used to Manage Severe Sciatica. **Spine. Apr 15;28(8):750-3, 2003.**

KAST R.E. Tumor necrosis factor has positive and negative self regulatory feedback cycles centered around cAMP. **Int J Immunopharmacol. Nov;22(11):1001-6, 2000.**

KAWATA R.; REDDY S.T.; WOLNER B.; HERSCHMAN H.R. Prostaglandin synthase 1 and prostaglandin synthase 2 both participate in activation-induced prostaglandin D₂ production in mast cells **Journal of Immunology 155(2): 818-825, 1995.**

KEIFER J.A., GUTTRIDGE D.C., ASHBURNER B.P, BALDWIN A.S. Jr. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of I kappa B kinase activity. **J Biol Chem Jun 22; 276(25):22382-7. Epub 2001 Apr 10. . 2001**

KELLY A.M., ARDAGH M., CURRY C., D'ANTONIO J., ZEBIC S. Intravenous chlorpromazine versus intramuscular sumatriptan for acute migraine. **J Accid Emerg Med. Jul;14(4):209-11. 1997**

KENNEDY, J.C., ALEXANDER, I.J., HAYES, K.C.. Nerve supply of the human knee and its functional importance. **Am J Sports Med. Nov-Dec;10(6):329-35, 1982.**

KENYON B., BROWNE F., D'AMATO R.. Effects of thalidomide and metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Exp. Eyes. Res. 64:971-8, 1997.**

KLAUSNER J.D., MAKONKAWKEYOON S., AKARASEWI P., NAKATA K., KASINRERK W., CORRAL L., DEWAR R.L., LANE H.C., FREEDMAN V.H., KAPLAN G. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human

- immunodeficiency virus type 1 and M. tuberculosis infection. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. Mar 1;11(3):247-57, 1996.**
- KLIMIUK P.A., SIERAKOWSKI S., LATOSIEWICZ R., CYLWIK B., SKOWRONSKI J., CHWIECKO J. Serum cytokines in different histological variants of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol. Jun;28(6):1211-7, 2001.**
- KUNKEL, S., STANDIFORD, T., CHENSUE, S.W., KASAHARA, K., STRIETER, R.M. Cellular and molecular mechanisms of cytokine networking. **Agents. Actions. Suppl. 32: 205, 1991.**
- KWIATKOWSKI D., MOLYNEUX M.E., STEPHENS S., CURTIS N., KLEIN N., POINTAIRE P., SMIT M., ALLAN R., BREWSTER D.R., GRAU G.E., et al. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. **Q J Med. Feb;86(2):91-8, 1993.**
- LARSEN, C.G., ZACHARIAE, C.O.C., OPENHEIM, J.J. AND MATSUSHIMA, K. Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblasts in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor. . **Biochem Biophys. Res. Commn. 160: 1403, 1989.**
- LAUTERBACH, R., GRABOWSKA, A., MARCINKIEWICZ, J. Effect of pentoxifylline on nitric oxide released by murine macrophages. **Biol Neonate.;67(1):72-6, 1995.**
- LE, J. & VILCEK, Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **J. Lab. Invest. 56: 234, 1987.**
- LENZ W. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet; 1:45, 1962.**
- LEVINE J., TAIWO J.D., Heller P.H: Hyperlgesic pain: inflammatory and neurophic. In Hiperlgesia and allodynia. **WD willis, Jr (ed). New York, Raven Press, , pp174-198, 1992.**
- LOGAN T.P. Persistent phantom limb pain: dramatic response to chlorpromazine. **South Med J. Dec;76(12):1585, 1983.**
- LOFTIS, L.L., MEALS, E.A., ENGLISH, B.K. Differential effects of pentoxifylline and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase by murine macrophages. **J Infect Dis. Apr;175(4):1008-11, 1997.**

- LORENZETTI B.B., POOLE S., VEIGA F.H., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13. **Eur Cytokine Netw. Apr-Jun;12(2):260-7**, 2001.
- LORENZETTI, B.B., VEIGA, F.H., CANETTI, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw. Oct-Dec;13(4):456-61**, 2002.
- LOWMAN, M.N., BENYON, R.C., CHURCH, M.K. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. **Br. J. Pharmacol. 95**: 121, 1998.
- MAGALHÃES, J.F.G., VIANA, C.F.G., ARAGÃO JR, A.G., MORAES, V.G., RIBEIRO R.A., VALE., M.R. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytoterapy Research, vol II**, 183-188, 1997.
- MAINI R., ST CLAIR E.W., BREEDVELD F., FURST D., KALDEN J., WEISMAN M., SMOLEN J., EMERY P., HARRIMAN G., FELDMANN M., LIPSKY P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. **Lancet. Dec 4;354(9194):1932-9**, 1999.
- MANNAIONI P.F., MASINI E., PISTELLI A., SALVEMINI D., VANE J.R. Mast cells as a source of superoxide anions and nitric oxide-like factor: relevance to histamine release. **Int J Tissue React.;13(6):271-8**, 1991.
- MARONE, G., COLUMBO, M., TRIGGIANI, M., CIRILLO, R., GENOVESE, A., FORMISANO S. Inhibition of IgE-mediated release of histamine and peptide leucotriene from human basophils and mast cells by forskolin. **Biochem. Pharmacol. 36**: 13-20, 1987.
- MARQUES L.J, ZHENG L., POULAKIS N., GUZMAN J., COSTABEL U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. **Am J Respir Crit Care Med. Feb;159(2):508-11**, 1999.
- MARSHALL J.S, LEAL-BERUMEN I, NIELSEN L, GLIBETIC M, JORDANA M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. **J Clin Invest. Feb 15;97(4):1122-8**, 1996.

- MASINI E., SALVEMINI D., PISTELLI A., MANNAIONI P.F., VANE J.R.. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. **Agents Actions. May;33(1-2):61-3**, 1991.
- MATSUSHIMA, K., OPPENHEIM, J.J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. **Cytokine 1: 2**, 1989.
- MAYER, E.A., GEBHART, G.F. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. **Gastroenterology. Jul;107(1):271-93**, 1994.
- MCBRIDE, W. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 2:1358, 1961.
- McHUGH S.M., RIFKIN I.R., DEIGHTON J., WILSON A.B., LACHMANN P.J., LOCKWOOD C.M., EWAN P.W. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clin Exp Immunol. Feb;99(2):160-7**, 1995.
- McKENZIE, A.N., CULPEPPER, J.A., DE WAAL MALEFYT, R., BRIÈRE, F., PUNNONEN, J., AVERSA, G., SATO, A., DANG, W., COCKS, B.G., MENON, S. et al. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90: 3735,1993.
- MEHL-MADRONA LE. Comparison of ketorolac-chlorpromazine with meperidine-promethazine for treatment of exacerbations of chronic pain. **J Am Board Fam Pract. May-Jun;12(3):188-94**, 1999.
- MELZAK, R. AND WAL P., The Challenge of pain. **England – New York Basic, Book**, pp 171-2 1976.
- MENGOZZI M., FANTUZZI G., FAGGIONI R., MARCHANT A., GOLDMAN M., ORENCOLE S., CLARK B.D., SIRONI M., BENIGNI F., GHEZZI P. Chlorpromazine specifically inhibits peripheral and brain TNF production, and up-regulates IL-10 production, in mice. **Immunology. Jun;82(2):207-10**, 1994.
- MERSKEY H. Pharmacological approaches other than opioids in chronic non-cancer pain management. **Acta Anaesthesiol Scand. Jan;41(1 Pt 2):187-90**, 1997
- MEYRING M., MUHLENBROCK C., BLASCHKE G. investigation of the stereoselective in vitro biotransformation of thalidomide using dual

- ciclodextrin system in capillary electrophoresis. **Electrophoresis** **21(15)**:3270-9, 2000.
- MILLAN M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol. Jan;57(1)**:1-164, 1999
- MILLER J.M., GINSBERG M., MCELFAATRICK G.C. AND SHONBERG I.L.,
The antiinflammatory effect and the analgesic property of contergan-268. **Antibiot. Med. Clin. Ther.**, 7:743-746, 1960.
- MISMURA K., MINAGAWA M., TSUJII, Y., KUMAZAWA, T. Prostaglandin E2 – induced sensitization of the heat response of canine visceral polymodal receptor in vitro. **Neurosc. Lett.** 161: 117-119, 1993.
- MOHRLAND J.S., JOHNSON E.E., VONVOIGTLANDER P.F. An ultrasound-induced tail-flick procedure: evaluation of nonsteroidal antiinflammatory analgesics. **J Pharmacol Methods. Jun;9(4)**:279-82, 1983.
- MOREIRA A.L. SAMPAIO E.P. ZMUIDZINAS A., FRINDT P. SMITH K.A., KAPLAN G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor a by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med****177**:1675-80, 1993.
- MOREIRA A.L. WANG J., SARNO E.N., KAPLAN G. Thalidomide protects mice against LPS induced shock, **Braz. J. Med Biol Res** **30**: 1199-1207, 1997.
- MORELAND L.W. The role of cytokines in rheumatoid arthritis: Inhibition of cytokines in therapeutic trials. **Drugs Today (Barc). Apr-May;35(4-5)**:309-19, 1999.
- MORELAND L.W., BUCY R.P., WEINBLATT M.E., MOHLER K.M., SPENCER-GREEN G.T., CHATHAM W.W. Immune function in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. **Clin Immunol. Apr;103(1)**:13-2, 2002.
- MUCHAMUEL T., MENON S., PISACANE P., HOWARD M.C., COCKAYNE D.A. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. **J Immunol. Mar 15;158(6)**:2898-903, 1997.
- MULLER R. Hemoheological and peripheral vascular diseases: a new therapeutic approach. **J. Med.** **12**: 209-235, 1981.
- NAKAMURA, M., FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** **135(2)**: 145, 1987.

- NATHAN C.F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest** Feb;79(2):319-. 1987.
- NAUSEEF W.M., ROOT R.K., NEWMAN S.L., MALECH H.L. Inhibition of zymosan activation of human neutrophil oxidative metabolism by a mouse monoclonal antibody. *Blood*. Sep;62(3):635-44, 1983.
- NELSON S., BAGBY G.J., BAINTON B.G., WILSON L.A., THOMPSON J.J., AND SUMMER W.R. Compartmentalization of intra-alveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis Factor and pulmonary inflammatory response. **J. Infect. Dis.**159, 189-194, 1989.
- NETA, R. SAYERS, T. AND OPENHEIM, J.J. Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action. (eds. **BB Aggarwal and J. Vilcek**), **Marcel Dekker, Inc., New York**, pp 499, 1992.
- NETEA M.G., BLOK W.L., KULLBERG B.J., BEMELMANS M., VOGELS M.T., BUURMAN W.A., VAN DER MEER J.W.. Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. **J Infect Dis. Feb;171(2):393-9**, 1995.
- NEUNER P, KLOSNER G, SCHAUER E, POURMOJIB M, MACHEINER W, GRUNWALD C, KNOBLER R, SCHWARZ A, LUGER TA, SCHWARZ T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology. 1994 Oct;83(2):262-7**.
- NG S.S.W., BROWN M., FIGG W.D. Thalidomide, an antiangiogenic agent with clinical activity in cancer. **Biomed Pharmacother** 56:194-9, 2002.
- NIIRO H., OTSUKA T., IZUHARA K., YAMAOKA K., OHSHIMA K., TANABE T, HARA S., NEMOTO Y., TANAKA Y., NAKASHIMA H., NIHO Y. .Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. **Blood. Mar 1;89(5):1621-8**, 1997.
- NIIRO H., OTSUKA T., TANABE T., HARA S., KUGA S., NEMOTO Y., TANAKA Y., NAKASHIMA H., KITAJIMA S., ABE M., et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. **Blood. Jun 15;85(12):3736-45**, 1995.

- ONOE, Y., MIYAURA, C., KAMINAKAYASHIKI, T., NAGAI, Y., NOGUCHI, K., CHEN, Q.R., SEO, H., OHTA, H., NOZAWA, S., KUDO, I., SUDA, T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. **J. Immunol.** **156**: 758, 1996.
- OSWALD, I.P., WYNN, T.A., SHER, A., et al. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** **89(18)**: 8676, 1992.
- PARADA, C.A., YEH J.J., JOSEPH E.K. AND LEVINE J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. **Eur. J. Neuroc.** **17**: 1847-1852, 2003.
- PARK B.H., GOOD R.A., BECK N.P., DAVIS B.B. Concentration of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in human leucocytes during phagocytosis **Nat New Biol. Jan 6;229(1)**:27-9, 1971.
- PERKINS, M.N., KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.** **110(4)**: 441, 1993.
- PERRY, M.J., LAWSON, S.N. Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. **Neuroscience** **85**: 293 – 310, 1998.
- PETTIPHER E.R., SALTER E.D. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF-alpha in zymosan-induced arthritis. **Cytokine. Feb;8(2)**:130-3, 1996.
- PEUCKMANN V., STRUMPF M., ZENZ M., BRUERA E. Novel potential uses of thalidomide in the management of pain? A review of the literature. **Schmerz. Jun;17(3)**:204-10, 2003.
- PEUCKMANN, V., FISCH M., BRUERA E., Potential novel uses of thalidomide; focuses in palliative care. **Drugs** **200; 60**: 273-92. 2000.
- PISCIOTTA A.V. Agranulocytosis induced by certain phenothiazine derivatives. **JAMA. Jun 9;208(10)**:1862-8, 1969.

- PISCITELLI S.C., FIGG W.D., HAHN B., KELLY G., THOMAS S., WALKER R.E.
Single dose pharmacokinetics of thalidomide in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents chemother** **41(12)**:2797-9, 1997.
- POLLMACHER T., HAACK M., SCHULD A., KRAUS T., HINZE-SELCH D.
Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. **J Psychiatr Res.** **Nov-Dec;34(6)**:369-82, 2000
- POOLE S., LORENZETTI B.B., CUNHA J.M., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H.
Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1999 Feb;126(3):649-56.
Erratum in: **Br J Pharmacol May;127(1)**:314, 1999 b.
- POOLE, S., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. In **Watkins, L.R., Maier, S.F. (Eds.), Cytokines and Pain.** pp 59-87, 1999 a.
- POOLE, S., CUNHA, F.Q., SELKIRK, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H.. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. J. Pharmacol.** **115**: 684, 1995.
- PORTER JM, CUTLER BS, LEE BY, REICH T, REICHLER FA, SCOGIN JT, STRANDNESS DE. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. **Am Heart J.** **Jul;104(1)**:66-72, 1982.
- QUILITZ R. Thalidomide in oncology: the perfil and the promise. **JMCC** **6**:483-95, 1999.
- RADOMSKY C. L., LEVINE N. Thalidomide. **Dermatol Clin.** **19(1)**:87-103, 2000.
- RANG H.P., BEVAN S., DRAY A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones **Br Med Bull.** **Jul;47(3)**:534-48, 1991.
- RAO T.S., SHAFFER A.F., CURRIE J.L., ISAKSON P.C. Role of mast cells in calcium ionophore (A23187)-induced peritoneal inflammation in mice. **Inflammation.** 1994.
- REED W.R., DEGOWIN R.L. Suppressive effects of pentoxifylline on natural killer cell activity. **J Lab Clin Med.** **Jun;119(6)**:763-71, 1992.

- REIMOLD AM. TNFalpha as therapeutic target: new drugs, more applications. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. Dec;1(4):377-92, 2002.
- RENZ , H., GONG, J.H., SCHMIDT, A., NAIN, M., Gemsa, d., release of tumor necrosis factor from macrophages: enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. **J. immunol.** **141**, 2388-2393, 1988.
- RIBEIRO R.A., FLORES C.A., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**. **Aug;73(4):472-7**, 1991.
- RIBEIRO R.A., FLORES C.A., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H., DE LUCCA F.L. Partial characterization of the RNA from LPS-stimulated macrophages that induces the release of chemotactic cytokines by resident macrophages. **Mol Cell Biochem**. Jul 19;148(2):105-13, 1995.
- RIBEIRO, R.A., SOUZA-FILHO, M.V., SOUZA, M.H., OLIVEIRA, S.H., COSTA, C.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, H.S. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB4, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol**. **Jan;112(1):27-35**, 1997.
- RIBEIRO R.A., VALE M.L., THOMAZZI S.M., PASCHOALATO A.B., POOLE S, FERREIRA S.H., CUNHA F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**. **Jan 3;387(1):111-8**, 2000.
- RIDLEY D.S. Reactions in leprosy. **Lepr Rev**. **Apr;40(2):77-81**, 1969.
- ROCHA F.A., ARAGAO A.G. JR, OLIVEIRA R.C., POMPEU M.M., VALE M.R., RIBEIRO R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res**. **Sep;48(9):485-90**, 1999.
- RÖCKEN, M., RACKE. M. AND SHEVACH, E.M. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. **Immunol. Today** **17**: 225, 1996.
- ROUBIN R., MENCIA-HUERTA J.M., LANDES A., BENVENISTE J. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-acether). IV. Impairment of acetyl-transferase activity in thioglycollate-elicited mouse macrophages. **J Immunol**. **Aug;129(2):809-13**. , 1982.
- ROWLAND T.L. MCHUGH S.M., DEIGHTON J., DEARMAN R.J., EWAN P.W., KIMBER I., Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of

- cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology** **40**:11-20, 1998.
- ROWLAND TL, MCHUGH SM, DEIGHTON J, DEARMAN RJ, EWAN PW, KIMBER I. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology**. **Jul;40(1)**:11-20, 1998.
- SACHS D, CUNHA FQ, POOLE S, FERREIRA SH. Tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity **Pain**. **Mar;96(1-2)**:89-97, 2002.
- SALVEMINI D., MASINI E., ANGGARD E., MANNAIONI P.F., VANE J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun**. **Jun 15;169(2)**:596-601, 1990.
- SAMPAIO E.P., KAPLAN G., MIRANDA ^a, NERY J.A., MIGUEL C.P., VIANA S.M., SARNO E.N. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J Infect Dis**. **Aug;168(2)**:408-14, 1993.
- SAMPAIO E.P., MORAES M.O., NERY J.A., SANTOS A.R., MATOS H.C., SARNO E.N. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor- α (TNF- α) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clin Exp Immunol**. **Feb;111(2)**:300-8, 1998.
- SAMPAIO E.P., SARNO E.N., GALILY R., COHN Z.A. AND KAPLAN G. Thalidomide inhibits Tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.** **173**: 699-703, 1991
- SARNO E.N., GRAU G.E., VIEIRA L.M.M. AND NERY A.C. serum levels of TNF- α and IL-1 β during leprosy reactional states. **Clin Exp. Immunol.** **84**: 103, 1991.
- SCHAFERS M, BRINKHOFF J, NEUKIRCHEN S, MARZINIAK M, SOMMER C. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- α and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. **Neurosci Lett** **Sep 14;310(2-3)**:113-6, 2001.

- SCHANDENE L., VANDENBUSSCHE P., CRUSIAUX A., ALEGRE M.L., ABRAMOWICZ D., DUPONT E., CONTENT J., GOLDMAN M. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. **Immunology. May;76(1):30-4, 1992.**
- SCHMIDT-CHOUDHURY A, GLENN T. FURUTA, JACKIE A. LAVIGNE, STEPHEN J. GALLI, AND BARRY K. WERSHIL. The Regulation of Tumor Necrosis Factor-alpha Production in Murine Mast Cells: Pentoxifylline or Dexamethasone Inhibits IgE-Dependent Production of TNF-alpha by Distinct Mechanisms **Cellular Immunology 171**, 140–146,1996.
- SCHULER U., EHNINGER G. Thalidomide: rationale for renewed use in immunological disorders. **Drug Saf. Jun;12(6):364-9, 1995.**
- SCOTT W.A., ZRIKE J.M., HAMILL A.L., KEMPE J., COHN Z.A. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. **J Exp Med. Aug 1;152(2):324-35, 1980.**
- SEITZ M., LOETSCHER P., DEWALD B., TOWBIN H., CESKA M., BAGGIOLINI M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes--regulation by IFN-gamma and IL-4. **J Immunol. Feb 15;152(4):2060-5, 1994.**
- SEMENENKO, F.M., CERVERO, F. Afferent fibres from the guinea-pig ureter: size and peptide content of the dorsal root ganglion cells of origin. **Neuroscience 47**: 197 – 201, 1992.
- SHEAR, M.J., PERRAULT, A.,. Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. **J. Natl. Cancer Inst. 4**, 416–468, 1943.
- SHEKIN J. Further observation with thalidomide in lepra reactions. **Lepr Rev. Oct;36(4):183-7, 1965.**
- SHIBATA K., WATANABE T. Inactivation of the vascular permeability-increasing activity of bradykinin by mycoplasmas. **FEMS Microbiol Lett. Nov;53(1-2):149-52, 1989.**

- SICUTERI F., FRANCIULLACI, F., FRANCHI, G., DEL BIANCO, P.L.
Serotonin-bradykinin potentiation on the pain receptors in man. **Life Sciences** **4**: 309- 316, 1965.
- SMITH, K.A., LACHMAN, L.B., OPPENHEIN, J.J. AND FAVATA, M.F. The functional relationship of the interleukins. **J. Exp. Med.** **151**: 1551, 1980.
- SMITH R.V., WALLER E.S., DOLUISIO J.T., BAUZA M.T., PURI S.K., HO I, LASSMAN H.B. Pharmacokinetics of orally administered pentoxifylline in humans. **J Pharm Sci. Jan**;75(1):47-52, 1986.
- SNIDER, W.D., MCMAHON, S.B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. **Neuron.** **20**: 629 – 32, 1998.
- SOMMER C., MARZINIAK. M., MYERS R.R. The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. **Pain. Jan**;74(1):83-91, 1998.
- SOMMER C., SCHAFERS M., MARZINIAK M., TOYKA K.V. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. **J Peripher Nerv Syst. Jun**;6(2):67-72, 2001.
- SOUZA GE, CUNHA FQ, MELLO R, FERREIRA SH. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions. Jul**;24(3-4):377-80, 1988.
- STEAD R.H, DIXON M.F., BRAMWELL N.H., RIDDELL R.H., Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. **Gastroenterology. Sep**;97(3):575-85, 1989.
- STEPHENS T., BUNDE C., FILLMORE B. mechanisms of action in thalidomide teratogenesis. **Biochem. Pharmacol.** **59**:1489-99, 2000.
- STERANKA, L.R., BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pain and inflammation. In: **Burch, R.M. (Ed) Bradykinin antagonists, Basic and Clinical Research. Marcel Dekker, New York**, p 191, 1991.
- STERANKA, L.R., DEHAAS, C.J., VAVREK, R.J., STEWART, J.M., ENNA, S.J., SNYDER, S.H. Antinociceptive effects of bradykinin antagonists, **Eur. J. Pharmacol.** **136**: 261, 1987.
- STERANKA, L.R., MANNING, D.C., DEHAAS, C.J., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., O'CONNOR, J.R., VAVREK, R.J., STEWART, J.M., SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator, receptors are localized to

sensory neurons, and antagonists has analgesic actions. **Procl. Natl. Acad. Sci. USA 85**: 3245, 1988.

STIRILING, D. I. **Pharmaceutical News 3**:17, 1996

STRIETER R.M., REMICK D.G., WARD P.A., SPENGLER R.N., LYNCH J.P. 3RD, LARRICK J., KUNKEL S.L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. **Biochem Biophys Res Commun. Sep 30;155(3)**:1230-6, 1988.

STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., SHOWELL, H.J., et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. **Science 243(4897)**: 1467,1989.

SULLIVAN G.W., CARPER H.T., NOVICK W.J.JR, MANDELL G.L. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. **Infect Immun. Jul;56(7)**:1722-9, 1988.

SWEITZER S., MARTIN D., DELEO J.A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience.;103(2)**:529-39, 2001

TAFFET S.M., SINGHEL K.J., OVERHOLTZER J.F., SHURTLEFF S.A. .Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. **Cell Immunol. May;120(2)**:291-300, 1989.

TAIWO, Y.O., BJERKNES, L.K., GOETZL, E.J AND LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience 32**: 577, 1989.

TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hiperalgesia. **Brain Res. 458**: 402, 1988.

TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of AMPc-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience 44**: 131-135, 1991.

TAKEMURA R, WERB Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am J Physiol. Jan;246(1 Pt 1)**:C1-9, 1984.

- TANNENBAUM C.S., HAMILTON T.A. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. **J Immunol. Feb 15;142(4):1274-80, 1989.**
- TARAZONA R., GONZALEZ-GARCIA A., ZAMZAMI N., MARCHETTI P., FRECHIN N., GONZALO J.A., RUIZ-GAYO M., VAN ROOIJEN N., MARTINEZ C., KROEMER G. Chlorpromazine amplifies macrophage-dependent IL-10 production in vivo. **J Immunol Jan 15;154(2):861-70, 1995.**
- TARGAN S.R., HANAUER S.B., VAN DEVENTER S.J., MAYER L., PRESENT D.H., BRAAKMAN T., DEWOODY K.L., SCHAIBLE T.F., RUTGEERTS P.J. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group **N Engl J Med. Oct 9;337(15):1029-35, 1997.**
- TEIXEIRA M.J., FIGUEIRÓ, A.B. Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento/ Manoel Jacobsen Teixeira, João Augusto Bertuol Figueiró – São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001
- TEO S.K., SCHEFFER M.R., KOOK K.A., TRACEWELL W.G., COLBURN W.A., STIRILING D.I. Effect of a high-fat meal on thalidomide pharmacokinetics and relative bioavailability of oral formulations in healthy men and women. **Biopharm Drug. Dispos. 21(1):33-40, 2000.**
- THANHAUSER A., REILING N., BOHLE A., TOELLNER K.M., DUCHROW M., SCHEEL D., SCHLUTER C., ERNST M., FLAD H.D., ULMER A.J. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity **Immunology. Sep;80(1):151-6, 1993.**
- THOMAS D. KANTARJIAN H., The revitalization of thalidomide. **Ann. Oncol.; 12:885-6, 2001**
- THOMAZZI S.M., RIBEIRO R.A., CAMPOS D.I., CUNHA F.Q., FERREIRA S.H. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediates the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediators of inflammation, 6: 195-200, 1997.**
- THOMAZZI, S.M. Participação de macrófagos e citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções

abdominais. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Depto. de Fisiologia e Farmacologia – UFC**, 1996.

TONUSSI C.R., FERREIRA S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur J Pharmacol. May 12;326(1):61-5**, 1997.

TONUSSI C.R., FERREIRA S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain. Mar;48(3):421-7**, 1992.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain. Jul;82(1):81-7**, 1999.

TOUSSIROT E., LAFFORGUE P., BOUCRAUT J., DESPIEDS P., SCHIANO A., BERNARD D., ACQUAVIVA P.C. Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. **Rheumatol Int.;13(5):175-80**, 1994.

TOUSSIROT, E., et al. Serum levels of interleukin 1- tumor necrosis factor- soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies. **Rheumatol.Int.13 :175 –180**, 1994.

TRAJKOVIC, V., BADOVINAC, V., POPADIC, D., HADZIC, O., STOJKOVIC, MM. Cell-specific effects of pentoxifylline on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression. **Immunology. Nov;92(3):402-6**, 1997.

TSENG S. PAK G. WASHENIK K. POMERANZ M.K., SHUPACK J.L. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanisms of action, side effects and potential uses. **J. Am Acad. Dermatol 35(6): 969-79**, 1996.

ULICH T.R., YI E.S., YIN S., SMITH C., REMICK D. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VII. The soluble interleukin-1 receptor and the soluble tumor necrosis factor receptor II (p80) inhibit acute inflammation.

VALE M.L. Atividade analgésica das interleucinas 4, 10 e 13 (IL₄, IL-10 e IL-13) na dor inflamatória experimental. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Depto. de Fisiologia e Farmacologia – UFC**, 2000

- VALE M.L., MARQUES J.B., MOREIRA C.A., ROCHA F.A., FERREIRA S.H., POOLE S., CUNHA F.Q., RIBEIRO R.A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J Pharmacol Exp Ther.** **Jan;304(1):**102-8, 2003.
- VAN DAMME, J. DE LEY, M., VAN SNICK, J., et al. The role of interferon-beta 1 and the 26-kDa protein (interferon-beta 2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.** **139(6):** 1867, 1987.
- VAN DULLEMEN H.M., VAN DEVENTER S.J., HOMMES D.W., BIJL H.A., JANSEN J., TYTGAT G.N., WOODY J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody(cA2). **Gastroenterology.** **Jul;109(1):**129-35, 1995.
- VAN FURTH A.M., VERHARD-SEIJMONSBERGEN E.M., VAN FURTH R., LANGERMANS J.A. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF-alpha, IL-1 beta IL-10 by human leucocytes. **Immunology.** **Jun;91(2):**193-6, 1997.
- VANDENABEELE P., DECLERCQ. W., VANHAESEBROECK B., GROOTEN J., FIERS W. Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. **J Immunol.** **Mar 15;154(6):**2904-13, 1995.
- VANDENABEELE, P. et al. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Trends Cell Biol.** **5,** 392–399, 1995.
- VÉRONIQUE BAUD AND MICHAEL KARIN Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives **TRENDS in Cell Biology Vol.11 No.9** September 2001.
- VIANA C.F.G., ARAGÃO JR., A.G.M., RIBEIRO, R.A., MAGALHÃES J.F.G., VALE, M.R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia volume LXIX, No 4:** 349-354, 1998.
- WATKINS L.R., GOEHLER L.E., RELTON J., BREWER M.T., MAIER SF. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res. Sep 18;692(1-2):**244-50, 1995a.

- WATKINS, L.R., MAIER S.F., GOEHLER L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain** **63**: 289-302. 1995b.
- WATT I., COBBY M. Treatment of rheumatoid arthritis patients with interleukin-1 receptor antagonist: radiologic assessment. **Semin Arthritis Rheum.** **Apr;30(5 Suppl 2)**:21-5, 2001.
- WIEMANN, B., Starnes, C.O.,. Coley's toxins, tumor ne-crosis factor and cancer research: a historical perspective. **Pharmacol. Ther.** **64**, 529–564, 1994.
- WIESENFELD-HALLIN, Z., HALLIN, R.G. The influence of the sympathetic system on mechanoreception and nociception. A review. **Hum Neurobiol** **3(1)**: 41, 1984.
- WINDMEIER C., GRESSNER A.M. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. **Gen Pharmacol.** **Aug;29(2)**:181-96, 1997.
- WORDLICZEK J., SZCZEPANIK A.M., BANACH M., TURCHAN J., ZEMBALA M., SIEDLAR M., PRZEWLOCKI R., SEREDNICKI W., PRZEWLOCKA B. The effect of pentoxifylline on post-injury hyperalgesia in rats and postoperative pain in patients. **Life Sci.** **Feb 11;66(12)**:1155-64, 2000.
- WUYTS A., GOVAERTS C., STRUYF S., LENAERTS J.P., PUT W., CONINGS R., PROOST P., VAN DAMME J. Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO alpha and GRO gamma from tumor cells and leukocytes reveals NH2-terminal heterogeneity. Functional comparison of different natural isoforms. **Eur J Biochem.** **Mar;260(2)**:421-9, 1999.
- YABUKI S., ONDA A., KIKUCHI S., MYERS R.R. Prevention of compartment syndrome in dorsal root ganglia caused by exposure to nucleus pulposus. **Spine.** **Apr 15;26(8)**:870-5, 2001.
- YOSHIDA A., YOSHIDA S., HATA Y., KHALIL A.K., ISHIBASHI. T., INOMATA H. The role of NF-kappaB in retinal neovascularization in the rat. Possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of the interleukin-8 family. **J Histochem Cytochem.** **Apr;46(4)**:429-36. 1998
- YOSHIZAKI K., NISHIMOTO N., MIHARA M., KISHIMOTO T. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized

anti-IL-6 receptor antibody. **Springer Semin Immunopathol.**;20(1-2):247-59, 1998.

ZABEL, P., WOLTER, D.T., SCHONHARTING, M.M., SCHADE, U.F. Oxpentifylline in endotoxaemia. **Lancet Dec 23-30;2(8678-8679):**1474-7, 1989.

ZINETTI M., GALLI G., DEMITRI M.T., FANTUZZI G., MINTO M., GHEZZI P., ALZANI R., COZZI E., FRATELLI M. Chlorpromazine inhibits tumour necrosis factor synthesis and cytotoxicity in vitro. **Immunology. Nov;86(3):**416-21, 1995.

ZUCALI, J.R., DINARELLO, C.A., OBLON, D.J., GROSS, M.A., ANDERSON, L. AND WAINER, R.S. J. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. **Clin. Invest. 77: 1857**, 1986.

ZUCKER S., ZARRABI H.M., SCHUBACH W.H., VARMA A., DERMAN R., LYSIK R.M., HABICHT G., SEITZ P.M. Chlorpromazine-induced immunopathy: progressive increase in serum IgM. **Medicine (Baltimore). Mar;69(2):**92-100, 1990.