

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS E CITOCINAS (TNF- α , IL-1
e IL-8) NA MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA NO
MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS**

SARA MARIA THOMAZZI

**Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro
de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO

**FORTALEZA
1996**

FC-00002683-8

Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Fisiologia e Farmacologia (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer) da Universidade Federal do Ceará e de Farmacologia (Laboratório de Inflamação e Dor) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, e contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq).

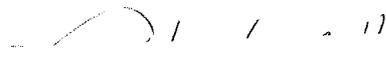
**PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS E
CITOCINAS (TNF- α , IL-1 E IL-8) NA
MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA NO
MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS**

SARA MARIA THOMAZZI

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 10.05.1996

BANCA EXAMINADORA



Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)



Profa. Glória Emília Petto de Souza



Prof. Francisco Airton Castro da Rocha

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Feliz é a nação cujo "Deus" é o "Senhor".

SALMO 33:12

Ao meu "Deus", criador de todas as coisas,
eterno e invisível, mas "Real".

Aos meus pais Valdemar e Maria do Carmo,
e ao meu irmão Samuel José, pelo carinho
e compreensão constantes.

Ao Wadson, pelo carinho e companherismo,
tornando mais fácil a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho. De modo especial:

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pelos muitos ensinamentos e pela segurança na orientação, além da extrema compreensão.

Aos Profs. Drs. Fernando de Queiroz Cunha e Sérgio Henrique Ferreira pela eficiência na co-orientação do trabalho e, principalmente, pela amizade e carinho.

À Profa. Dra. Berenice Borges Lorenzetti e à Ieda Regina dos Santos pela valiosa ajuda nos ensaios de dor e pela amizade e companheirismo permanentes.

Aos amigos do dia-a-dia, Marcus Vinícius P. Souza Filho, Marcellus Henrique L.P. Souza, Maximiliano L.P. Souza, Antônio Aldo Melo Filho, Cláudio Cortez dos Santos e Marcos Emanuel T. Maia, pela fácil convivência e pelo apoio e carinho sempre presentes, elementos indispensáveis na execução deste trabalho.

À Mariana Lima Vale e Lisiane Vasconcelos pela ajuda na realização da parte experimental.

À amiga Neomésia Issajuara da Silva Freiri pelos auxílios técnicos, inclusive na produção do MNF e, principalmente, pela eterna disponibilidade, companheirismo e cumplicidade.

À Eliane B. Castehtini de Barros, Diva Amabili de Souza, Kátia dos Santos, Sérgio Rosa, Fátima Rodrigues de Souza e Antônio Haroldo Pinheiro Ferreira, pelo apoio paralelo no tocante aos cuidados com os animais experimentais, limpeza, separação e autoclave de material, e ainda pela forma amável no dia-a-dia.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Daniel H. Melo e Benedito A. Carneiro Filho por, gentilmente, terem participado na digitação e no preparo dos gráficos desta dissertação.

Aos grandes amigos Maria de Jesus (Loirinha), Paulo de Tarso (Pardal), Sulamita Vieira (Sulinha), Marcus e Verbena Vale e Neile Torres, entre outros que tornaram minha permanência em Fortaleza bem mais calorosa e saudosa.

Ao Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, Fabiana Maria do Nascimento, Marta Célia Araújo de Freitas, Sílvia Maria Azevedo de Lima, Joana Barbosa de Moura e D. Neuza A. Mobrize de Campos, além do Evandro Raphaeloski pela disposição em ajudar no tocante à parte burocrática, de secretaria e digitação.

Ao Paulo Sérgio Castro de Oliveirae ao Samuel Nystron C. Araújo pela facilitação do trabalho diário e pela convivência.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à ciência.

Aos demais amigos dos Laboratórios de Inflamação e Dor da FMRP-USP e de Farmacologia da Inflamação e do Câncer-UFC, por terem tornado essa jornada extremamente agradável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

AAc	Ácido acético
ACTH	Adrenocorticotrofina
AMP	Adenosina monofosfato
AMP-c	Adenosina monofosfato cíclico
Atn	Atenolol
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BK	Bradicinina
BK ₁	Receptor do tipo B ₁ de bradicinina
BK ₂	Receptor do tipo B ₂ de bradicinina
C	Controle
Cg	Carragenina
CHX	Ciclohexemida
Con A	Concanavalina A
CRF	Fator liberador de corticotrofina
CSF-1	Fator estimulador de colônia 1
C5a	Quinto componente do complemento ativado
DEXA	Dexametasona
DIL.	Diluição
EP	Pirógeno endógeno
EPM	Erro padrão da média
FMLP	N-Formil-L-Metionil-L-Leucil-L-Fenil-Alanina
g	Gramas (s)
GCP	Proteína quiniotática para granulócitos
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GMP-c	Guanosina monofosfato cíclico
Gua	Guanetidina
h	Hora (s)
HOE 140	[(D-Arg ¹ ,Thi ⁶ ,(1,2,3,4-tetrahydroisoquilonin-2-yl-arbonyl) ⁸ ,((3as,7as)octahydroindol-2-yl-carbonyl) ⁹]bradykinin

IFN	Interferon
IL-1	Interleulina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ILO	Iloprost- derivado carbocíclico estável da prostaciclina - PGI ₂
INDO	Indometacina
i.p.	Intraperitoneal
IRO	Intermediários reativos do oxigênio
KDa	Quilodalton(s)
K(D)PT	Tripeptídeo antagonista de IL-1 β
kg	Quilograma(s)
l	Litro
L	Cavidades peritoneais submetidas à lavagem prévia
LAF	Fator ativador de linfócitos
LEM	Mediador leucocítico endógeno
LPS	Lipopolissacarídeo de bactérias
LT	Linfotoxina
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
M	Molar
MDNCF	Fator quimiotático de neutrófilos derivado de monócitos
mg	Miligrama(s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mm ²	Milímetro (s) ao quadrado
MNF	Fator nociceptivo secretado por macrófagos
MONAP	Peptídeo ativador de neutrófilos derivado de monócitos
n ^o	Número
NAF	Fator ativador de neutrófilos

ng	Nanograma(s)
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada
PGI ₂	Prostaciclina
PHA	Fitohemaglutinina
pI	Ponto isoelétrico
Pkc	Proteína-quinase C
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonuclear
Ptol	Paracetamol
p/v	Peso por volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r	Recombinante
rhu	Recombinante humano
rmu	Recombinante murino
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA poli A(+)	Ácido ribonucleico poliadenilado
RNA poli A(-)	Ácido ribonucleico não poliadenilado
RPMI	Meio de cultura RPMI
rpm	Rotações por minuto
SAL	Salina
s.c.	Subcutânea
Tg	Tioglicolato
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade(s) internacional(is)
v/v	Volume por volume
ZYM	Zymosan
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
<	Menor
%	Porcentagem
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUÇÃO.....	001
1. Macrófagos como Células Mediadoras na Agressão ao Organismo.....	002
1.1. Ontogenia e Distribuição dos Fagócitos Mononucleares.....	003
1.2. Atividade Funcional dos Macrófagos.....	005
2. Macrófagos e Secreção de Citocinas.....	011
2.1. Conceituação Geral de Citocinas.....	011
2.2. Interleucina 1 (IL-1).....	012
2.3. Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	017
2.4. Interleucina 8 (IL-8).....	021
3. Dor Inflamatória.....	023
3.1. Aspectos Gerais.....	023
3.2. Mediadores Allogênicos.....	025
4. Justificativas e Objetivos.....	028
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	030
1. Animais.....	031
2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	031
3. Meio de Cultura, Soluções, Corantes e Drogas.....	032
4. Obtenção do Sobrenadante de Cultura de Macrófagos.....	037
5. Teste Nociceptivo.....	039
6. Efeito de Diferentes Drogas sobre a Liberação e sobre a Atividade Nociceptiva do MNF.....	039

7. Efeito dos Soros Anti-Citocinas sobre a Atividade do MNF	040
8. Efeito Nociceptivo do TNF- α , IL-1 β e IL-8.....	041
9. Efeito do HOE 140 e da Bradicinina sobre as Atividades da Mistura de Citocinas e do MNF	041
10. Atividade Nociceptiva do Zymosan, da Carragenina, do Ácido Acético e do LPS	042
11. Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas pelo Zymosan, Carragenina, Ácido Acético e LPS.....	042
12. Efeito do Aumento de Macrófagos Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas pelo Zymosan e Ácido Acético	044
13. Efeito da Dexametasona nas Contorções Abdominais Induzidas pelo Zymosan, Ácido Acético e LPS.....	045
14. Efeito de Indometacina, Atenolol e Guanetidina sobre as Contorções Abdominais Induzidas pelo Zymosan e Ácido Acético	045
15. Efeitos dos Soros Anti-Citocinas sobre a Atividade Algôgena do Zymosan, Carragenina e Ácido Acético.....	045
16. Análise Estatística	046
III. RESULTADOS	047
1. Liberação de uma Atividade Algôgena por Macrófagos	048
2. Inibição <i>in vitro</i> da Liberação do MNF.....	049
3. Bloqueio da Atividade Nociceptiva do MNF	049
4. Envolvimento de Citocinas na Atividade Algôgena do MNF.....	052
5. Efeito do HOE 140 sobre as Atividades Nociceptivas da Mistura de Citocinas, MNF e da Bradicinina sobre a Atividade Nociceptiva da Mistura de Citocinas.....	056

6. Atividades Nociceptivas do Zymosan, da Carragenina, do Ácido Acético e do LPS.....	058
7. Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes na Atividade Nociceptiva do Iloprost, do Zymosan, do Ácido Acético, da Carragenina e do LPS.....	063
8. Efeito da Amplificação de Macrófagos Residentes sobre a Atividade Nociceptiva do Zymosan e do Ácido Acético	066
9. Efeito da Dexametasona sobre as Contorções Abdominais Induzidas pelo Zymosan, pelo Ácido Acético e pelo LPS.....	066
10. Efeito de Bloqueadores Prostaglandínico e Simpático sobre as Atividades Nociceptivas do Zymosan e do Ácido Acético.....	069
11. Efeito dos Soros Anti-Citocinas sobre as Contorções Abdominais Evocadas pelo Zymosan, pela Carragenina e pelo Ácido Acético.....	072
IV. DISCUSSÃO	076
V. CONCLUSÕES.....	089
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	091

RESUMO

No presente estudo avaliou-se *in vitro* e *in vivo* o papel de macrófagos e de citocinas no desencadeamento da atividade nociceptiva induzida por estímulos inflamatórios (zymosan, ácido acético, carragenina e LPS) no modelo de contorções abdominais em camundongos.

A análise dos resultados demonstrou que macrófagos cultivados na presença de LPS são hábeis em liberar no sobrenadante da cultura um fator capaz de induzir atividade nociceptiva (MNF) quando injetado intraperitonealmente. A liberação de MNF foi bloqueada por inibidores de síntese protéica (ciclohexemida) ou de citocinas (dexametasona), mas não o foi por inibidores de ciclooxigenase (indometacina ou paracetamol), indicando sua provável natureza protéica. O efeito do MNF, por outro lado, foi atenuado por indometacina, paracetamol, dexametasona e por agentes simpatolíticos como guanetidina e atenolol, e completamente bloqueado pela associação de indometacina com guanetidina, ou com atenolol, indicando que sua atividade deve-se à ativação dos componentes eicosanóide e simpático da dor inflamatória. A atividade do MNF foi ainda sensível ao tratamento com HOE 140, antagonista dos receptores BK₂ da bradicinina, sugerindo o envolvimento desta cinina neste efeito.

Observou-se ainda que a atividade do MNF parece resultar da associação dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8 e TNF- α) presentes nas amostras de MNF, já que sua atividade foi parcialmente neutralizada pela adição de anti-soros específicos (anti-IL-1, anti-IL-8 ou anti-TNF- α), além do que a associação das mesmas induziu atividade nociceptiva de comportamento semelhante àquela do MNF, fato este não observado quando tais citocinas foram ensaiadas isoladamente. A manipulação quantitativa da população de células peritoneais residentes, constituída principalmente por macrófagos, demonstrou que a

diminuição destas células pela lavagem prévia da cavidade peritoneal reduziu significativamente a atividade nociceptiva do zymosan, ácido acético, LPS ou da carragenina, sem, no entanto, modificar aquela induzida por um análogo de prostaciclina (Iloprost). Por outro lado, o aumento dessa população através do tratamento com tioglicolato, amplificou as respostas nociceptivas do ácido acético e do zymosan. Em adição, foi ainda demonstrado que a injeção intraperitoneal isolada de anti-soros anti-IL-1, anti-IL-8 ou anti-TNF- α bloqueou significativamente a atividade nociceptiva daqueles estímulos.

Os dados sugerem fortemente que macrófagos parecem desempenhar um papel central na deflagração da nocicepção induzida por zymosan e ácido acético, e provavelmente também por carragenina e LPS, no modelo de contorções abdominais, possivelmente liberando mediadores tais como IL-1, IL-8 e TNF- α , os quais atuam estimulando a síntese de metabólitos da ciclooxigenase e ativando o sistema simpático.

ABSTRACT

In the present study it was evaluated *in vivo* and *in vitro* the role of macrophages and cytokines in the trigger of nociceptive activity induced by inflammatory stimuli (zymosan, acetic acid, carrageenin and LPS) in a mice model of abdominal writhes.

The results showed that LPS- stimulated macrophages monolayers were able to induce the release of a macrophage factor (MNF) which was active in inducing nociceptive activity when injected intraperitoneally. The release of MNF was inhibited by the pretreatment of the macrophages with inhibitors of protein synthesis (cycloheximide) and cytokines production (dexamethasone) but not by cyclo-oxygenase inhibitors (indomethacin or paracetamol), showing its probable protein origin. On the other hand, MNF induced-nociception was blocked in a dose-dependent manner by pretreatments of the animals with indomethacin, paracetamol or dexamethasone, partially reduced by pretreatment with guanethidine and atenolol, and totally abolished by association of guanethidine or atenolol with indomethacin. These results suggest that MNF activity seems to occur by the activation of the two inflammatory sensitization pathways, one dependent of production of cyclo-oxygenase metabolites and the other dependent of the generation of sympathomimetic amines. In addition the effect of MNF was also inhibited by a BK₂ receptor antagonist (HOE 140) which provided evidence that bradykinin was involved in this effect.

It was also observed that the MNF activity seems to be a consequence of an association of IL-1, IL-8 and TNF- α effects present in the MNF samples, since its activity was partially inhibited by the preincubation with specific antisera against IL-1, IL-8 and TNF- α . In addition, intraperitoneal injection of recombinant cytokines association induced nociceptive activity acting similarly to MNF; this fact was not observed when those cytokines were tested alone.

The modification of peritoneal resident cell population, constituted mainly by macrophages, showed that depletion of peritoneal cells by previous lavage of peritoneal cavities decreased the nociceptive activity of zymosan, acetic acid, LPS and carrageenin without modified the nociceptive activity of a prostacyclin analogous (Iloprost); and the increase of macrophage population by previous thioglycollate administration amplified the nociceptive responses to acetic acid and zymosan. Also it was verified that the pretreatment of peritoneal cavities with isolated anti-IL-1, anti-IL-8 or anti-TNF- α antiserum blocked significantly the nociceptive responses of those stimuli.

In conclusion, the results suggest that macrophages play an important role in the trigger of the nociceptive activity induced by zymosan and acetic acid (probably also by carrageenin and LPS) in the mice model of abdominal writhes, possibly via the release of a cascade of mediators such as IL-1, IL-8 or TNF- α , which ones activate the synthesis of cyclo-oxygenase metabolites and release of sympathomimetic amines.

I. INTRODUÇÃO

1. MACRÓFAGOS COMO CÉLULAS MEDIADORAS NA AGRESSÃO AO ORGANISMO

Nos estágios iniciais da maioria dos processos inflamatórios, a célula leucocitária predominante no foco é o neutrófilo. Com o passar do tempo surgem, progressivamente, outros tipos celulares. Atualmente, acredita-se que o retardo no aparecimento dos macrófagos no foco inflamatório se deve ao fato dos monócitos migrarem em uma velocidade menor do que a dos neutrófilos.

A partir dos experimentos pioneiros de METCHNIKOFF realizados em 1884 (citado por METCHNIKOFF, 1905), originou-se o conceito inicial do macrófago como célula removedora de resíduos e materiais indesejáveis do espaço extracelular, o qual pode hoje ser considerado como uma subestimação do papel potencial desta célula. Na realidade, estes fagócitos são células altamente ativas que prontamente respondem a sinais celulares e hormonais e, portanto, participam de uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos. Neste contexto, FERREIRA, em 1980, denominou os macrófagos residentes de *células de alarme*, os quais, quando em contato com invasores estranhos ao organismo, desencadeiam mecanismos de defesa, protegendo assim o hospedeiro dos estímulos injuriantes. Dados da literatura tem mostrado que macrófagos participam não só da fase crônica da reação inflamatória e da regulação da resposta imune, como também do desencadeamento e modulação de vários eventos descritos como sendo da fase aguda do processo inflamatório (WEIR, 1984; NATHAN, 1987; UNANUE & ALLEN, 1987).

1.1. Ontogenia e distribuição dos fagócitos mononucleares

As informações acumuladas sobre a origem e cinética, bem como sobre as semelhanças entre as características morfológicas, imunológicas e funcionais, dos diversos fagócitos mononucleares descritos até então levou VAN FURTH *et alii* em 1972 ao conceito do chamado Sistema Fagocítico-Mononuclear (VAN FURTH *et alii*, 1972).

O Sistema Fagocítico-Mononuclear é composto por células com semelhanças morfológicas e funcionais, formadas na medula óssea a partir de uma linhagem de células fagocíticas mononucleares que alcançam os tecidos através da corrente sangüínea. A célula mais imatura desta linhagem é o monoblasto, a partir da qual formam-se os promonócitos e destes os monócitos. Os monócitos entram na corrente sangüínea e, em segundos, migram para os tecidos, transformando-se em macrófagos. Dependendo da localização, os macrófagos adquirem características próprias e são, por isso, designados de maneiras diferentes, como exemplo podemos citar os histiócitos, as células de Kupffer, as células das micróglias, os osteoclastos e as células sinoviais do tipo A. Com base em novas informações sobre os precursores na medula óssea e localizações em condições normais e patológicas, mais células foram sendo descritas como pertencentes ao sistema fagocítico-mononuclear, de forma que hoje tem-se encontrado macrófagos em praticamente todos os tecidos e fluidos do organismo (VAN FURTH, 1988a; VAN FURTH, 1988b).

Cavidades serosas como a pleural e peritoneal possuem os chamados macrófagos residentes, os quais tem um tempo de vida relativamente longo variando de meses a anos (VAN FURTH, 1982; GORDON, 1986). Observa-se ainda que em tais cavidades pode ocorrer repovoamento, o qual se deve à migração de monócitos do sangue periférico, provenientes de maturação na medula óssea (VAN FURTH, 1988a). Em adição, tem sido descrito que em

alguns sítios como a cavidade peritoneal, baço e linfonodo, os macrófagos podem ter replicação local, bem como podem recircular como os linfócitos, migrando das cavidades para o sangue periférico e deste para os órgãos linfóides secundários como o baço, linfonodo e órgãos linfóides associados à mucosa (GORDON, 1986; VAN FURTH, 1988a; VAN FURTH, 1988b).

A produção, recrutamento e a recirculação de macrófagos em cavidades como a peritoneal pode ser drasticamente alterada através de estímulos exógenos. A injeção de algumas substâncias ou de microorganismos nestas cavidades, pode induzir um grande influxo de células para o local. Estes macrófagos recém-diferenciados dos monócitos do sangue foram denominados por VAN FURTH (1978), de macrófagos *elicitados* ou *inflamatórios*. Vários são os agentes descritos como elicitadores de macrófagos no peritônio, tais como: bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (NATHAN & ROOT, 1977), *Listeria monocytogenes* (BELLER, KIELY & UNANUE, 1980), Lipopolissacarídeos (LPS) de diversas bactérias, sulfato de dextrana, adjuvante de Freund incompleto, adjuvante de Freund completo (BENBEHANI, BELLER & UNANUE, 1985), tioglicolato de sódio (STEEG, MOORE & OPPENHEIM, 1980), proteose-peptona (STEINMAN *et alii*, 1980), fitohemaglutinina (NAGAOKA, KANEKO & YAMASHITA, 1988), concanavalina A (RAZ, SHAHAR & GOLDMAN, 1977) e carragenina (VIJAYAKUMAR, PALANIVEL & MUTHUKKARUPPAN, 1989), entre outros. Sabe-se, entretanto, que a atividade funcional destes macrófagos não é igual e varia dependendo do agente inoculado.

1.2. Atividade funcional dos macrófagos

Frente aos estímulos externos, os macrófagos desempenham um papel único na resposta tecidual. Primeiro, podem interagir com muitas moléculas extracelulares, internalizando-as e submetendo-as a alterações metabólicas intracelulares. Tais moléculas podem estar livres em solução ou formarem parte da estrutura de microorganismos (UNANUE & ALLEN, 1987). Segundo, são células altamente secretórias. Seus produtos de secreção, ao todo mais de 100 já descritos, incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, proteínas regulatórias tipo interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), além de derivados do ácido araquidônico (TAKEMURA & WERB, 1984; WERB *et alii*, 1986; NATHAN, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1988). A maioria destas 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). Terceiro, macrófagos interagem com linfócitos T e B, intervindo, portanto, nas respostas imunológicas (UNANUE & ALLEN, 1987). Além da apresentação de antígenos aos linfócitos, os macrófagos modulam tanto as funções dos linfócitos T como dos linfócitos B, através da liberação de várias monocinas, entre elas, a IL-1 tem um papel de destaque (WEIR, 1984; UNANUE & ALLEN, 1987). Quarto, os macrófagos possuem receptores na sua superfície para linfocinas, podendo a partir desta interação, adquirir novas propriedades, inclusive tornar-se *ativado* (UNANUE & ALLEN, 1987).

Macrófagos em repouso, quando expostos a uma variedade de agentes inflamatórios, sofrem profundas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais mudanças podem levar a atividades funcionais não expressas anteriormente pelos mesmos, bem como

incluem alterações na quantidade e secreção de enzimas e aumento de sua capacidade fagocítica e bactericida e ainda de seus efeitos tumoricidas. Nesse estado o macrófago é denominado *ativado* e, quando em contato com estímulos específicos, além de liberar seus produtos com maior eficiência, torna-se altamente microbicida e tumoricida (OGMUNSDOTTIR & WEIR, 1980; UNANUE & ALLEN, 1987; JOHNSTON JR, 1988; VAN FURTH, 1988b).

MACKANESS (1970), ao descrever algumas alterações funcionais que ocorrem em macrófagos de animais infectados com bactérias, usou o termo *ativado* para descrever as propriedades bactericidas aumentadas destas células. O termo *ativado* tem também sido usado em referência a macrófagos que mostram um aumento na capacidade para inibir parasitas intracelulares (OGMUNSDOTTIR & WEIR, 1980), bem como para descrever macrófagos que adquiriram competência para destruir células tumorais (EVANS & ALEXANDER, 1976; NORTH, 1978). Macrófagos que são expostos a irritantes tais como tioglicolato, óleo mineral, caseína, proteose-peptona e glicogênio, mostram mudanças funcionais menos marcantes, não incluindo efeitos bactericidas ou citocidas e tem sido referidos como *estimulados*, por alguns autores (EVANS & ALEXANDER, 1976; NORTH, 1978; OGMUNSDOTTIR & WEIR, 1980).

Entretanto, para VAN FURTH (1988b), o termo *estimulado* é impreciso e deve ser evitado nessas circunstâncias, já que a aplicação de um estímulo pode resultar tanto na elicitação de células como na própria ativação das mesmas ou em ambas. Para este autor, macrófagos de animais tratados com irritantes supracitados são melhor chamados de *elicitados*. Em adição, tem sido referido por este e por outros autores que macrófagos de focos inflamatórios ou *elicitados* por agentes, apresentam uma atividade funcional maior ou mesmo, são mais responsivos a agentes *ativadores* que os macrófagos residentes e monócitos

(ADAMS & HAMILTON, 1987; VAN FURTH, 1988b), além de serem maiores em tamanho, apresentarem um aumento na velocidade e extensão de espalhamento em vidro e plástico, aumento de pseudópodes, bem como de grânulos citoplasmáticos e vacúolos (OGMUNSDOTTIR & WEIR, 1980).

Ativação de macrófagos foi originalmente descrita em animais infectados com patógenos intracelulares, tais como: Micobactéria, *Listeria* e *Brucella* (NORTH, 1969; RUSKIN, McINTOSH & REMINGTON, 1969; MACKANESS, 1970) e *Toxoplasma* e *Trypanosomas* (REMYNTOON, KRAHENBUHL & MENDENHALL, 1972; MACLEOD & REMINGTON, 1977). Nestas condições a ativação dos macrófagos é dependente da atividade de linfócitos que foram especificamente sensibilizados ao agente infectante. Os macrófagos ativados pelos produtos de tais linfócitos sensibilizados expressam sua atividade de uma maneira não específica, sendo capazes de desempenhar efeitos microbicidas contra uma variedade de agentes infecciosos ou efeitos citotóxicos em células alvo. Sabe-se hoje que entre as linfocinas, o interferon gama (IFN- γ) tem um papel de destaque na mediação do processo de ativação endógeno de macrófagos (ADAMS & HAMILTON, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1988; MILLON, LEBASTARD & MARCHAL, 1988).

A ativação pode ser conseguida *in vitro* pela exposição de macrófagos a substâncias exógenas tais como lipopolissacarídeo (LPS) proveniente de bactérias e protozoários (ADAMS & HAMILTON, 1988), RNA de dupla fita de origem viral (ALEXANDER & EVANS, 1971), copolímero de pirano (BAIRD & KAPLAN, 1975; SCHULTZ, PAPAMATHEAKIS & CHIRIGOS, 1977), poliribonucleotídeos sintéticos (EVANS & ALEXANDER, 1976) e ainda RNA poli A(+) obtido de baço de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* (BERTOLINI & DE LUCCA, 1986) e RNA poli A(+) e poli A(-) obtido de macrófagos estimulados *in vitro* com LPS (RIBEIRO *et alii*, 1993).

Entre as muitas alterações funcionais que expressem um estado *ativado* para os macrófagos, podemos destacar: aumento do tamanho e da velocidade de espalhamento em vidro e plástico, aumento da taxa de oxidação de glicose, aumento de síntese protéica, secreção e aumento de síntese de enzimas lisossomais, aumento na expressão de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, aumento de fagocitose de partículas não opsonizadas, expressão de novos antígenos de superfície, aumento de responsividade a estímulos quimiotáxicos, habilidade para matar ou inibir o crescimento de patógenos intracelulares, aumento da liberação de intermediários reativos de oxigênio (IRO), atividade citotóxica para células tumorais e outras células de divisão rápida e aumento da produção e liberação de várias citocinas como IL-1 e TNF- α entre outras (NATHAN, 1987; ADAMS & HAMILTON, 1988).

Durante o processo de ativação, tem sido proposto que, a competência que adquire o macrófago para desempenhar múltiplas funções, obedeceria a um controle genético provavelmente diversificado (COHN, 1978), bem como responderia a uma diversidade de sinais indutores e supressivos presentes no microambiente (UNANUE, 1984), o que em última análise, resultaria na modulação de grande número de proteínas funcionais que seriam secretadas ou se distribuiriam ao longo da membrana celular (HAMILTON & ADAMS, 1987).

A presença de grande quantidade de receptores, observada na superfície do macrófago, assim como o grande número de constituintes moleculares que são produzidos e secretados, sugerem que as propriedades fisiológicas e bioquímicas e mesmo os vários estados de ativação devam ser regulados independentemente (MCKAY & RUSSEL, 1986; HAMILTON & ADAMS, 1987).

Em resposta à interação do sinal empregado com o seu receptor específico, é referido que assim como ocorre com o lipopolissacáride de bactérias (LPS) e com o interferon

gama (IFN- γ), observa-se o surgimento de uma variedade de sinais intracelulares que podem, inclusive, culminar na expressão de genes como os protooncogenes c-fos, c-myc, JE e KC (ADAMS & HAMILTON, 1987; HAMILTON & ADAMS, 1987). Nesse sentido, tem sido proposto que, pelo menos quatro cascatas bioquímicas podem ser iniciadas, distintamente, por ativadores tipo LPS ou IFN- γ em macrófagos responsivos. A primeira cascata, cujo ativador principal é o IFN- γ , resulta em uma estimulação tardia na atividade da proteína-quinase C (PKc) e um lento influxo de íons cálcio. A segunda cascata consiste na hidrólise do fosfatidilinositol, produção de diacilglicerol, produção de inositol tri e tetra-fosforilado, estimulação rápida da PKc, rápido influxo de íons cálcio e sódio e ainda expressão de RNAm para os oncogenes c-myc, c-fos e JE. Entre os principais ativadores dessa cascata se incluem, o LPS, o fator ativador de plaquetas (PAF), peptídeos N-formilados e em menor extensão, o TNF- α . A terceira via, por outro lado, cursa com expressão independente de outros genes (ex. KC, P-38), manifestada pela síntese rápida e transitória de uma série de proteínas de vida curta. O LPS e parcialmente o TNF são também ativadores dessa via.

Nota-se que o LPS pode iniciar duas cascatas independentes. Tem sido descrito, entretanto, que alguns efeitos do LPS tipo supressão da expressão de antígenos Ia na superfície do macrófago parecem se dever à produção de prostaglandinas E₂, com conseqüente aumento dos níveis de AMP cíclico, o que poderia ser considerado como uma quarta cascata (BECTON, ADAMS & HAMILTON, 1985; HAMILTON *et alii*, 1986; HAMILTON & ADAMS, 1987; KOERNER, HAMILTON & ADAMS, 1987; ADAMS & KOERNER, 1988).

Durante o processo de ativação em resposta ao LPS, IFN- γ ou ambos, a composição protéica da membrana plasmática do macrófago, assim como o caráter dos seus produtos secretórios sofrem profundas modificações (ADAMS & HAMILTON, 1984). Tais alterações parecem obedecer a uma complexa regulação, de forma que: a) algumas proteínas

são aumentadas enquanto outras são diminuídas; b) alterações em ambas as direções podem ser iniciadas pelo LPS ou IFN- γ ou por LPS mais IFN- γ e c) IFN- γ e LPS podem agir em direções opostas (HAMILTON & ADAMS, 1987).

A competência que adquire o macrófago para matar células tumorais, por exemplo, parece depender de um mecanismo complexo que torna esta célula capaz de capturar a célula tumoral via receptor Fc de imunoglobulinas ou lectinas e de secretar substâncias citotóxicas como os intermediários reativos do oxigênio (IRO), TNF- α , interferons e interleucinas (HAMILTON & ADAMS, 1987). Entretanto, para que esta competência seja adquirida, são necessários pelo menos dois sinais. O primeiro desencadeado pelo IFN- γ , tornaria os macrófagos mais responsivos a um segundo sinal, exemplo, o LPS, de forma que, macrófagos expostos inicialmente ao IFN- γ e posteriormente ao LPS, tornam-se células com alto potencial em destruir células tumorais (HAMILTON & ADAMS, 1987).

Foi demonstrado recentemente que o IFN- γ induz RNAm para moléculas de histocompatibilidade classe II (REVEL & CHEBOTH, 1986) enquanto que LPS induz RNAm para TNF (BEUTLER & CERAMI, 1986) e para IL-1 (FUHLBRIGGE *et alii*, 1987), parecendo existir uma interação entre estes dois sinais, pois: IFN- γ aumenta a expressão de RNAm para TNF iniciada por LPS (HAMILTON & ADAMS, 1987) e este suprime a expressão de Ia na superfície celular e também de antígenos de histocompatibilidade classe II, ambos induzidos por IFN- γ (STEEG, JOHNSON & OPPENHEIM, 1982).

Além do IFN- γ , outros mediadores endógenos parecem modular de diversas maneiras, a atividade funcional de macrófagos. Dessa forma, tem sido descrito que o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) induz, em macrófagos peritoneais residentes, um aumento na expressão de receptores Fc de imunoglobulina G e do antígeno Mac-1, além de um incremento na expressão de IL-1 de membrana (MORRISEY *et*

alii, 1988). Em adição, a IL-2 parece ser capaz de estimular *in vitro* a capacidade tumoricida de monócitos assim como a secreção de IRO (MALKOVSKY *et alii*, 1987) e de TNF (ECONOMOU *et alii*, 1989), além de poder atuar como co-fator para IFN- γ na indução de atividade parasiticida de macrófagos peritoneais residentes e da medula óssea de camundongos (BELOSEVIC *et alii*, 1990). Ainda nesse contexto, foi demonstrado, recentemente, que a interleucina 3 (IL-3) é capaz de induzir, em macrófagos, a transcrição do RNAm para IL-1 e quando na presença de LPS, induzir a sua secreção para o meio extracelular (FRENDL, FENTON & BELLER, 1990). A interleucina 4 (IL-4), por outro lado, é ativa em induzir, em macrófagos peritoneais elicitados, a expressão de antígenos de histocompatibilidade classe II e capacidade de apresentação de antígeno (CRAWFORD *et alii*, 1987). A secreção de IRO tem sido demonstrada em macrófagos cultivados na presença de IFN- γ , GM-CSF, TNF- α e PAF (SOLBACH, MOLL & ROLLINGHOFF, 1991).

2. MACRÓFAGOS E SECREÇÃO DE CITOCINAS

2.1. Conceituação geral de citocinas

Sob certas condições, sabe-se que macrófagos secretam uma série de substâncias, muitas das quais, mediadores importantes em vários eventos descritos como de fase aguda do processo inflamatório tais como: febre, dor, edema, quimiotaxia de polimorfonucleares e secreção de proteínas de fase aguda. Entre tais mediadores, tem-se dado muita atenção, ultimamente, a um grupo de proteínas regulatórias, chamadas no seu conjunto de citocinas. O termo citocina foi inicialmente sugerido por COHEN em 1974 (ver COHEN *et alii*, 1979) para

definir proteínas derivadas de células outras que não linfócitos (para estas aplica-se o termo linfocinas) que influenciam as ações de outras células. Outros termos, tais como monocina, fator de crescimento, interleucina, interferon (IFN) e integrina são também usados para descrever tais proteínas. Uma definição moderna do termo citocina é de um polipeptídeo/proteína (glicoproteína) de PM maior que 5 KDa capaz de ser induzida e que produz efeitos parácrinos, autócrinos e até endócrinos mediados por receptores específicos em células-alvo. É importante notar que a maioria das citocinas não são produzidas constitutivamente, mas requerem ativação celular para suas sínteses. A definição portanto inclui as interleucinas, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônia, etc (HENDERSON & POOLE, 1994). A interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8), tem nesse contexto, um papel de destaque.

2.2. Interleucina 1 (IL-1)

Em 1940 teve início a história da interleucina 1, quando ela foi caracterizada pela sua capacidade de provocar febre. A partir de então, ficou conhecida pelo nome de pirógeno endógeno (ATKINS, 1960).

Posterior a purificação bioquímica do pirógeno endógeno (EP), relatou-se ser esta substância a mediadora de todos os efeitos biológicos descritos para uma outra proteína conhecida pelo nome de mediador leucocítico endógeno (LEM), caracterizado anteriormente pelas seguintes propriedades: indução de síntese de proteínas de fase aguda, redução das concentrações de ferro e zinco plasmáticas e aumento de neutrófilos circulantes (MERRIMAN, PULLIAM & KAMPSCHMIDT, 1977).

GERY, GERSHON e WAKSMAN, em 1972, demonstraram que culturas de células aderentes de roedores e também de humanos, presumivelmente macrófagos, produziam uma substância com propriedades ativadoras sobre linfócitos, a qual denominaram fator ativador de linfócitos (LAF). Eles analisaram também o sinergismo do LAF com concentrações subótimas de mitógenos de células T, tais como, a fitohemaglutinina (PHA) e a concanavalina A (Con A) na indução da proliferação de timócitos de camundongos. Em seguida, GERY & HANDSCHUMACHER (1974) verificaram ser o LAF uma proteína que apresentava um peso molecular por volta de 15.000 daltons, determinado pela técnica de cromatografia de filtração em gel.

Vários estudos realizados posteriormente, denotaram a existência de uma série de fatores com outras atividades biológicas, porém com as mesmas características bioquímicas do LAF de forma que, em 1979, durante o II Workshop Internacional de Imunologia, os fatores reconhecidos pelas seguintes siglas: BAF, LAF, HP-1, MP, EP, LEM e TPF passaram a ser identificados por interleucina 1 (AARDEN *et alii*, 1979).

Bioquimicamente distintas, mas estruturalmente relacionadas, 2 moléculas de IL-1 foram reconhecidas e identificadas em experimentos de clonagem gênica, a forma alfa (IL-1 α), de pI 5,0, em macrófagos murinos (GUBLER *et alii*, 1986) e a forma beta (IL-1 β), de pI 7,0, em monócitos humanos (AURON *et alii*, 1984). Posteriormente, demonstrou-se a existência das duas formas de IL-1, tanto em humanos como em camundongos. As duas moléculas de IL-1 humanas possuem 26% de homologia nas suas seqüências de aminoácidos e são codificadas por genes diferentes, ambos situados no cromossomo 2. Na maioria dos tecidos humanos o RNAm que codifica para IL-1 β é predominante sobre o que codifica para IL-1 α , na proporção 2 para 1 (DINARELLO, 1988; ARAI *et alii*, 1990).

Ambas as formas de IL-1 são aparentemente sintetizadas como precursores polipeptídeos de 31 Quilodaltons (KDa) que quando clivados geram os peptídeos extracelulares maduros de 17,5 KDa. Ademais, têm sido detectadas formas de IL-1, de aproximadamente 23 KDa, associadas à membrana plasmática (KURT-JONES *et alii*, 1986; MATSUSHIMA *et alii*, 1987; ARAI *et alii*, 1990). Tornou-se evidente também, que a IL-1 β é a forma presente em maior concentração nos fluidos biológicos (LE & VILCEK, 1987). Estudos recentes sugerem a existência de pelo menos 2 tipos diferentes de receptores para IL-1 α e IL-1 β , o receptor do tipo I e o receptor do tipo II, ambos presentes tanto na superfície celular como na forma solúvel (SIMS & DOWER, 1994). Estes autores também sugerem que na superfície da célula a afinidade da IL-1 α é maior para o receptor do tipo I, ao passo que a IL-1 β parece possuir maior afinidade para o receptor do tipo II, embora sua afinidade pelo receptor do tipo I seja semelhante àquela apresentada pela IL-1 α . Nesse contexto, tem ainda sido mostrado que o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), possui maior afinidade pelo receptor do tipo I (SIMS & DOWER, 1994).

Reconhecida inicialmente como um produto de fagócitos mononucleares ativados, hoje é sabido que moléculas de IL-1 são sintetizadas por uma grande variedade de células, entre as quais estão incluídas: os fibroblastos sinoviais, queratinócitos e células de Langerhans da pele; células mesangiais do rim; linfócitos B; células natural killer; astrócitos e células microgliais do cérebro; células endoteliais e do músculo liso de vasos sanguíneos; células epiteliais da gengiva, córnea e timo e ainda, linhagens de células T (DINARELLO, 1988; MIZEL, 1989).

Várias substâncias são capazes de induzir a produção de IL-1 em monócitos e macrófagos. Fatores exógenos como as endotoxinas, exotoxinas, hemaglutininas de vírus, protozoários (DURUM & OPPENHEIM, 1989) e substâncias endógenas como C5a, fator

estimulador de colônia 1 (CSF-1), TNF- α , TGF- β , a própria IL-1 (AKIRA *et alii*, 1990) além de opióides endógenos como a β -endorfina (APTE, DURUM & OPPENHEIM, 1990).

São múltiplas e diversificadas as ações biológicas da IL-1, tanto no que diz respeito ao tipo de efeito como em relação ao sítio celular envolvido. Entre estes sítios celulares destacam-se aqueles envolvidos no processo inflamatório, tais como: neutrófilos, fibroblastos, células sinoviais, condrócitos, células endoteliais, hepatócitos e osteoclastos, bem como aqueles participantes da resposta imune: linfócitos T, linfócitos B e macrófagos (MIZEL, 1989).

A IL-1, como produto de macrófagos, desempenha um papel importante na ativação de linfócitos T. Ela tanto aumenta a produção de IL-2 como induz a expressão de receptores para IL-2 em células T ativadas pelo antígeno. Estes efeitos permitem uma rápida expansão em número, de células T antígeno-estimuladas (SHIRAKAWA *et alii*, 1986; DINARELLO, 1988). Em linfócitos B, a IL-1 parece cooperar com outras citocinas, tais como a IL-4 na ativação destas células, aumentando a proliferação e induzindo a secreção de imunoglobulinas (ARAI *et alii*, 1990). Alguns destes efeitos em células B podem ser mediados via indução, em outros tipos celulares, de IL-6, que é um fator de diferenciação de células B (ARAI *et alii*, 1990).

A capacidade em induzir a síntese de prostaglandinas talvez seja uma das propriedades biológicas mais importantes da molécula de IL-1, e contribui efetivamente para a indução dos efeitos locais e sistêmicos descritos para esta citocina, principalmente os efeitos pró-inflamatórios. Em relação a estes, está bem documentado que a IL-1: induz febre, como resultado de sua ação direta sobre o centro termorregulador, mediada via aumento de síntese e liberação de prostaglandinas E_2 , no hipotálamo anterior; aumenta a síntese e secreção de proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, haptoglobulina, α -2-macroglobulina, amilóide A e P,

proteína C reativa) pelos hepatócitos; promove o acúmulo de granulócitos, particularmente neutrófilos, nos sítios de inflamação através do aumento da expressão de moléculas de adesão, tipo CD₁₁/CD₁₈, nas células endoteliais e posterior migração destes granulócitos para o espaço extra-vascular; causa edema e produz secreção de outras citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 (DINARELLO, 1988; LARRICK & KUNKEL, 1988; MIZEL, 1989). Ainda nesse contexto, recentemente FERREIRA *et alii* demonstraram ser a IL-1 β um potente agente hiperalgésico, cerca de 3.000 vezes superior a IL-1 α , e que a mesma exerceria esse efeito via liberação de metabólitos do ácido araquidônico, mais especificamente de prostaglandinas (FERREIRA *et alii*, 1988). Nesse particular, estes autores delinearão, a partir do estudo da molécula de IL-1 β , a região responsável pela hiperalgisia observada e desenvolveram, a partir daí, um tripeptídeo analgésico análogo (K(D)PT) capaz de antagonizar não apenas a hiperalgisia desencadeada pela IL-1 β mas também, parcialmente, aquela devida à injeção de carragenina.

Os seguintes efeitos são ainda atribuídos à IL-1: induz a liberação de vários peptídeos hipotalâmicos e da pituitária, incluindo as morfina, o fator liberador de corticotrofina (CRF), a adrenocorticotrofina (ACTH) e a somatostatina (BERNTON *et alii*, 1987; SAPOLSKI *et alii*, 1987). Além disso, a IL-1 pode agir diretamente sobre a glândula adrenal e promover a síntese de hormônios esteróides (DINARELLO, 1988).

A manutenção e amplificação da resposta inflamatória requer uma produção sustentada de células inflamatórias pela medula óssea. Nesse particular, a IL-1 é um potente fator estimulador de colônias além de estimular a liberação de outros fatores estimuladores de colônia (LARRICK & KUNKEL, 1988).

2.3. Fator de necrose tumoral (TNF)

O fator de necrose tumoral foi descoberto como sendo uma substância presente no soro induzida por endotoxina bacteriana e, caracterizado pela propriedade de provocar necrose hemorrágica em tumores implantados em animais de laboratório (CARSWELL *et alii*, 1975).

Entretanto, este fenômeno já havia sido evidenciado no século passado, quando então, COLEY (1983), citado por OLD (1985) e outros notaram que um processo de infecção intercorrente poderia, muitas vezes, provocar a necrose hemorrágica de certas neoplasias, em pacientes com câncer e infecção. O produto bacteriano, responsável pela indução de necrose tumoral, foi isolado por SHEAR *et alii* (1943) citado por CARSWELL *et alii* (1975), sendo hoje conhecido como lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana de bactérias gram-negativas.

Subseqüentemente, os estudos de O'MALLEY, ACHINSTEIN & SHEAR, 1962, evidenciaram que a inoculação de soro proveniente de camundongos desafiados com uma dose de LPS, produzia em outro camundongo receptor a necrose de tumores implantados. Posteriormente, CARSWELL *et alii*, 1975, em experimentos muito semelhantes, verificaram que a inoculação de soros, colhidos duas horas após a injeção de LPS, oriundos de animais anteriormente sensibilizados com bacilos Calmette-Guerin (BCG) e corinebactérias, também provocava nos animais receptores a necrose hemorrágica de tumores implantados. Os soros desses animais apresentavam igualmente a capacidade de *in vitro* provocar a lise e morte de células transformadas. O ensaio biológico em cultura de células foi então utilizado para a caracterização e purificação bioquímica do então chamado TNF (Fator de Necrose Tumoral), produzido por macrófagos e monócitos, como também, o produzido por linhagens de células

monocíticas, em diversos laboratórios (GREEN, DOBRJANSKY & CHIASSON, 1982; KULL & CUATRECASAS, 1984; AGGARWAL *et alii*, 1985).

Alguns anos antes da descoberta do TNF, RUDDLE & WAKSMAN (1967) e GRANGER & WILLIAMS (1968) também comprovaram a existência de um fator solúvel, produzido por linfócitos T ativados, com igual atividade citotóxica sobre células em cultura, que ficou conhecido, a partir de então, pelo nome de linfotoxina (LT). Os estudos de caracterização bioquímica revelaram que a LT é uma glicoproteína composta de subunidades de 20 KDa e 25 KDa, encontrada, na forma ativa, rearranjada em dímeros e trímeros, já o TNF tem um peso molecular em torno de 17 KDa, tem 157 aminoácidos sendo as subunidades rearranjadas em dímeros, trímeros ou pentâmeros (AGGARWAL, MOFFAT & HARKINS, 1984).

Já estão clonados em bactérias os genes que codificam a seqüência de aminoácidos do TNF- α (TNF) e a seqüência que codifica o TNF- β (linfotoxina), ambos presentes no cromossomo humano número 9. Essas duas moléculas, quando de origem humana, apresentam 28% de homologia, nas suas seqüências de aminoácidos (BEUTLER & CERAMI, 1986; BEUTLER & CERAMI, 1987). Embora distintas imunologicamente, pois são reconhecidas por diferentes anticorpos, essas duas moléculas, TNF- α e TNF- β , ligam-se a um único receptor de alta afinidade identificado em diversas células-alvo (AGGARWAL *et alii*, 1985; BAGLIONI *et alii*, 1985; RUBIN *et alii*, 1985; CREASEY, YAMAMOTO & VITT, 1987). No entanto, os pesos moleculares dessa proteína receptora tem variado entre 54 a 138 KDa, demonstrando tratar-se de um receptor de múltiplas subunidades.

Muitos tipos celulares são capazes de produzir e secretar TNF- α após estimulação apropriada. Nesse sentido, monócitos e macrófagos produzem grandes quantidades de TNF- α após serem estimulados com: LPS, IFN- γ , IL-1, GM-CSF, o próprio TNF- α , enterotoxinas,

toxina-1 da síndrome do choque tóxico, fator corda de micobactérias, vírus, antígenos fúngicos ou parasitários e C5a (OLD, 1985; PHILLIP & EPSTEIN, 1986; BEUTLER & CERAMI, 1988). Recentemente, foi demonstrado que mastócitos, de diversas origens, secretam TNF- α quando estimulados com LPS, concanavalina A ou com ésteres de forbol (GORDON, BURD & GALLI, 1990). Interessante também foi a demonstração por esses mesmos autores de que mastócitos peritoneais contem, mais do que macrófagos ou linfócitos, constitutivamente, grandes estoques de TNF- α pré-formado, pronto para imediata liberação após estímulo celular apropriado.

Por outro lado, TNF- β parece ser exclusivamente produzido por linfócitos T e por linhagens de células linfoblastóides B, em resposta a estímulo antigênico específico, certos vírus ou exposição a vários mitógenos (BEUTLER & CERAMI, 1988).

O TNF- α inclui em suas ações biológicas um amplo espectro de efeitos, envolvendo desde células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos e linfócitos até células participantes do metabolismo celular, como os adipócitos e células do tecido muscular. Estas ações do TNF- α tem sido divididas em endócrinas e parácrinas ou tecido-específicas.

Podemos citar como exemplo de ação endócrina o seu envolvimento na patogênese do choque séptico induzido por bactérias gram-negativas. Nesse particular, tem sido demonstrado que a injeção de doses farmacológicas de TNF- α , mimetiza algumas das manifestações patológicas do choque séptico, tipo: febre, acidose metabólica, diarreia, hipotensão e coagulação intravascular disseminada (BEUTLER & CERAMI, 1987; KETTELHUT, FIERS & GOLDBERG, 1987; TRACEY *et alii*, 1987).

São ainda atribuídas ao TNF- α as seguintes propriedades: indução de proteínas com atividade pró-coagulante, inibição da síntese de trombomodulina de células endoteliais e indução da expressão gênica e da síntese de IL-1 em células endoteliais (LIBBY *et alii*, 1986;

NAWROTH *et alii*, 1986). Nesse sentido, a ação sinérgica do TNF- α e da IL-1 pode favorecer a formação de trombos, coagulação intravascular disseminada e a conseqüente oclusão de vasos sangüíneos. Estes efeitos podem explicar a hemorragia e a necrose tumoral induzidas pelo TNF em animais portadores de tumores (OLD, 1985).

Os efeitos parácrinos ou tecido-específicos mais estudados do TNF- α são aqueles relacionados à sua participação na mediação de vários dos eventos que ocorrem nos processos inflamatórios agudos e crônicos, entre os quais, destacam-se: ativação de neutrófilos, com conseqüente degranulação, produção de IRO, aumento da citotoxicidade para certos patógenos e aumento de atividade fagocítica (KLEBANOFF *et alii*, 1986; TSUJIMOTO *et alii*, 1986); quimiotaxia de neutrófilos e de monócitos; aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio; estimulação da produção de prostaglandinas E₂ e de collagenase por células sinoviais e condrócitos; proliferação de fibroblastos; aumento da reabsorção óssea por osteoclastos e diminuição da síntese óssea por osteoblastos; indução de proteínas de fase aguda no fígado; produção de IL-1 e IL-6 por células endoteliais e por macrófagos; produção de GM-CSF e G-CSF por células endoteliais (BEUTLER & CERAMI, 1988; LARRICK & KUNKEL, 1988).

Convém ressaltar que vários dos efeitos descritos acima podem ocorrer por estimulação direta do TNF- α sobre as células ou tecidos alvo. Entretanto, o TNF- α pode exercer alguns destes efeitos, indiretamente, tal qual a IL-1, iniciando uma intensa e multifocal resposta inflamatória, com participação de outros mediadores secundários como leucotrienos e PAF, além de uma série de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER & CERAMI, 1988). Nesse particular, recentemente, CUNHA *et alii*, 1992, em experimentos utilizando anti-soros específicos para várias citocinas, demonstraram que o TNF- α tem um papel central no desencadeamento da dor inflamatória, mediando a liberação de várias citocinas hiperalgésicas como IL-1, IL-6 e IL-8.

Na resposta imune, o papel do TNF- α , tem sido pouco estudado. Entretanto sabe-se que em linfócitos T, o TNF- α , geralmente em altas concentrações, induz a liberação de IFN- γ , aumenta a expressão de receptores para IL-2, e potencia a resposta proliferativa à antígenos e mitógenos (SCHEURICH *et alii*, 1987; YOKOTA, GEPPERT & LIPSKY, 1988). Já com relação aos linfócitos B, está descrito que o TNF- α induz *in vivo* o aumento de células secretoras de anticorpos para antígenos T-dependentes como hemáceas de carneiro, mas não para antígenos T-independentes como o polissacarídeo tipo III de pneumococo (GHIARA *et alii*, 1987) e *in vitro*, é capaz de induzir proliferação e secreção de imunoglobulinas (KEHRL, MILLER & FAUCI, 1987).

2.4. Interleucina 8 (IL-8)

A descoberta da interleucina 8 tem uma história recente e deve ser atribuída não a um, mas a vários pesquisadores que, trabalhando independentemente, demonstraram, quase simultaneamente, que monócitos principalmente, quando cultivados na presença de LPS, secretam proteínas com PM variando entre 7-9 KDa, mas com uma importante característica em comum qual seja a de induzir ativação e quimiotaxia de neutrófilos. Nesse sentido, várias foram as designações que esta molécula recebeu, inicialmente: peptídeo ativador de neutrófilos derivado de monócitos, MONAP (SCHRODER *et alii*, 1987), fator quimiotático de neutrófilos derivado de monócitos, MDNCF (YOSHIMURA *et alii*, 1987a e 1987b), fator ativador de neutrófilos, NAF (WALZ *et alii*, 1987; PEVERI *et alii*, 1988) e proteína quimiotática para granulócitos, GCP (VAN DAMME *et alii*, 1988). Pouco tempo depois, em fins de 1988 e por ocasião do I Simpósio Internacional de Citocinas Quimiotáticas realizado

em Londres, resolveu-se chamar de Interleucina 8 (IL-8) todos esses peptídeos quimiotáticos para neutrófilos descritos até então (WESTWICK, LI & CAMP, 1989).

Com a clonagem do gene que codifica a sequência de aminoácidos da IL-8 humana já realizada (MATSUSHIMA *et alii*, 1988) e conseqüente maior facilidade em se obter preparações recombinantes, muitos outros aspectos relativos a produção, liberação e atividade funcional dessa molécula, tornaram-se conhecidos.

Sabe-se que não só monócitos e macrófagos mas também células endoteliais (GIMBRONE *et alii*, 1989), linfócitos T (GREGORY *et alii*, 1988) e fibroblastos (OPPENHEIM *et alii*, 1989; VAN DAMME *et alii*, 1989) produzem e secretam IL-8. Além disso, posteriormente foi demonstrado que linhagens de hepatócitos humanos são capazes de expressar RNAm e atividade biológica para IL-8 em resposta a mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (THORNTON *et alii*, 1990).

A IL-8 tem sido implicada, no que diz respeito a atividade biológica, por diversos pesquisadores, como um importante mediador pró-inflamatório. Nesse sentido, IL-8 tem sido detectada em exsudatos inflamatórios (FINCHAM *et alii*, 1988) e parece desencadear eventos inflamatórios tais como hiperalgesia (CUNHA *et alii*, 1991a), febre (ZAMPRONIO *et alii*, 1991), liberação de histamina (WHITE *et alii*, 1989), degranulação de neutrófilos (LINDLEY *et alii*, 1988), ativação do *burst* respiratório com conseqüente formação de IRO (COLDITZ *et alii*, 1989), quimiotaxia de neutrófilos (SCHRODER *et alii*, 1987; YOSHIMURA *et alii*, 1987b) e de linfócitos (LARSEN *et alii*, 1989) e ainda migração de neutrófilos *in vivo*, em pele de coelhos (COLDITZ *et alii*, 1989; RAMPART *et alii*, 1989) e em cavidades peritoneais de ratos (RIBEIRO *et alii*, 1991).

Em relação aos seus efeitos pró-inflamatórios, recentemente, tem-se atribuído a IL-8 também algumas atividades antiinflamatórias. Dessa forma, foi demonstrado que a IL-8 age

em Londres, resolveu-se chamar de Interleucina 8 (IL-8) todos esses peptídeos quimiotáticos para neutrófilos descritos até então (WESTWICK, LI & CAMP, 1989).

Com a clonagem do gene que codifica a sequência de aminoácidos da IL-8 humana já realizada (MATSUSHIMA *et alii*, 1988) e conseqüente maior facilidade em se obter preparações recombinantes, muitos outros aspectos relativos a produção, liberação e atividade funcional dessa molécula, tornaram-se conhecidos.

Sabe-se que não só monócitos e macrófagos mas também células endoteliais (GIMBRONE *et alii*, 1989), linfócitos T (GREGORY *et alii*, 1988) e fibroblastos (OPPENHEIM *et alii*, 1989; VAN DAMME *et alii*, 1989) produzem e secretam IL-8. Além disso, posteriormente foi demonstrado que linhagens de hepatócitos humanos são capazes de expressar RNAm e atividade biológica para IL-8 em resposta a mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (THORNTON *et alii*, 1990).

A IL-8 tem sido implicada, no que diz respeito a atividade biológica, por diversos pesquisadores, como um importante mediador pró-inflamatório. Nesse sentido, IL-8 tem sido detectada em exsudatos inflamatórios (FINCHAM *et alii*, 1988) e parece desencadear eventos inflamatórios tais como hiperalgesia (CUNHA *et alii*, 1991a), febre (ZAMPRONIO *et alii*, 1991), liberação de histamina (WHITE *et alii*, 1989), degranulação de neutrófilos (LINDLEY *et alii*, 1988), ativação do *burst* respiratório com conseqüente formação de IRO (COLDITZ *et alii*, 1989), quimiotaxia de neutrófilos (SCHRODER *et alii*, 1987; YOSHIMURA *et alii*, 1987b) e de linfócitos (LARSEN *et alii*, 1989) e ainda migração de neutrófilos *in vivo*, em pele de coelhos (COLDITZ *et alii*, 1989; RAMPART *et alii*, 1989) e em cavidades peritoneais de ratos (RIBEIRO *et alii*, 1991).

Em relação aos seus efeitos pró-inflamatórios, recentemente, tem-se atribuído a IL-8 também algumas atividades antiinflamatórias. Dessa forma, foi demonstrado que a IL-8 age

como um indutor da adesão de neutrófilos a monocamadas de endotélio humano ativadas por citocinas (WHEELER *et alii*, 1988; GIMBRONE *et alii*, 1989) e que a sua injeção, por via endovenosa, é capaz de inibir a migração de neutrófilos elicitada por vários mediadores, incluindo IL-1, FMLP, C5a, LTB₄ e a própria IL-8 (HECHTMAN *et alii*, 1991). Corroborando estes achados, CUNHA *et alii* (1991b), demonstraram que o pré-tratamento de neutrófilos humanos com IL-8 ou TNF- α e IL-8 mais TNF- α , mas não com TGF- β , IL-6 e IFN- γ , tornava estas células menos responsivas ao efeito quimiotático do FMLP além de mostrarem que a injeção endovenosa destas 2 citocinas diminui significativamente a migração de neutrófilos provocada pela injeção intraperitoneal de carragenina.

No que concerne ao efeito pró-inflamatório da IL-8, importante contribuição foi dada por RIBEIRO *et alii* (1991), que demonstraram, pioneiramente, que a migração de neutrófilos *in vivo* induzida por IL-8, ocorria por um mecanismo indireto, via liberação por mastócitos mas não por macrófagos ou linfócitos, de fatores quimiotáticos.

3. DOR INFLAMATÓRIA

3.1. Aspectos gerais

A sensibilização de receptores da dor é o denominador comum em todos os tipos de dor inflamatória. Nesse contexto tem sido referido que na dor inflamatória existe um componente imediato, que ocorre logo após a lesão tecidual e é devido à estimulação direta das terminações nervosas sensoriais, e outro que se segue ao aparecimento da inflamação propriamente dita (MONCADA, FERREIRA & VANE, 1978). Este componente recebe a

denominação de hiperalgesia e é conceituado como uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso (LINDBLOM *et alii*, 1986).

Na verdade, a hiperalgesia é o acompanhante perceptual da inflamação, representando um reajuste limiar da dor no local da lesão, ou seja, a área inflamada torna-se fonte de dor notável, quando levemente tocada ou aquecida (CAMPBELL, 1989). A hiperalgesia que se segue à lesão e inflamação tecidual baseia-se, ao menos em parte, na sensibilização dos nociceptores por mediadores químicos, especificamente pelas prostaglandinas (FERREIRA, LORENZETTI & CORREA, 1978) e por mediadores simpatomiméticos (LEVINE *et alii*, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

Os eventos moleculares associados com a hiperalgesia ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, há evidências de que o aumento dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMP-c) e da concentração de Ca^{++} estão associados com a regulação positiva dos nociceptores. Neste particular tem sido demonstrado que a administração intraplantar de dibutilil AMP-c, ou ionóforo de Ca^{++} ou ainda de $BaCl_2$, o qual aumenta a concentração de Ca^{++} livre no citosol, causam hiperalgesia na pata do rato (FERREIRA & NAKAMURA, 1979). Em adição, a administração de prostaglandinas ou de simpatomiméticos (noradrenalina ou dopamina), conhecidos estimuladores da síntese neuronal de AMP-c, também são capazes de induzir hiperalgesia neste mesmo modelo. Por outro lado, pré-tratamento das patas com um antagonista de Ca^{++} ou com um agente bloqueador do influxo de cálcio, previne o surgimento de hiperalgesia (FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

A hipótese de que a hiperalgesia ocorre subsequente a um aumento nas concentrações citosólicas de AMP-c/ Ca^{++} tem também recebido o suporte experimental de outros pesquisadores usando diferentes testes de hiperalgesia (TAIWO *et alii*, 1989; FOLLENFANT, NAKAMURA & GARLAND, 1990).

Os eventos bioquímicos finais responsáveis pela regulação positiva do nociceptor ainda não estão completamente esclarecidos, mas parecem envolver a ativação da proteína-quinase A, com subsequente fosforilação de um canal iônico ou modulação de estruturas citosólicas que controlam os níveis intracelulares de cálcio. Há, entretanto, um sistema que pode regular negativamente os nociceptores sensibilizados. Bloqueio direto da hiperalgesia declarada foi observado após administração de dibutilil guanosina monofosfato cíclico (GMP-c) ou substâncias que estimulam a guanilato ciclase neuronal, tipo carbacol ou geradores de óxido nítrico (DUARTE *et alii*, 1992).

Parece, portanto, que a regulação funcional, positiva ou negativa, dos nociceptores é dependente de um balanço nas concentrações de AMP-c/GMP-c, no nociceptor.

3.2. Mediadores algogênicos

Durante o processo inflamatório, muitos mediadores de natureza protéica (por exemplo: interleucinas, fator de necrose tumoral) e lipídica (prostaglandinas, PAF), combinados com outras substâncias liberadas localmente, tanto pelas células residentes como pelas terminações nervosas dos tecidos, mantêm ou aumentam o processo inflamatório. Algumas destas substâncias são capazes de estimular diretamente os nociceptores provocando dor declarada enquanto outras, no caso de prostaglandinas e mediadores simpatomiméticos, são capazes de sensibilizar aqueles receptores. Substâncias com capacidade de causar dor declarada incluem, serotonina, histamina, substância P, bradicinina, entre outras. As prostaglandinas e os mediadores simpatomiméticos, através da sensibilização dos nociceptores e diminuição do limiar de excitabilidade dos mesmos, poderiam facilitar a atividade algogênica de muitas destas substâncias, desde que as concentrações das mesmas, no sítio de flogose, não

são suficientes para estimular os nociceptores, em intensidade suficiente (MONCADA, FERREIRA & VANE, 1978; CAMPBELL, 1989; PORTENOY, 1989).

Já está bem estabelecido que monócitos e macrófagos podem desempenhar um papel importante na regulação de várias funções celulares, através da secreção de citocinas, particularmente de IL-1 e TNF (LE & VILCEK, 1987). A participação dessas células na dor do processo inflamatório parece, ocorrer de forma direta através da liberação de prostaglandinas provocada por estímulo lesivo ou químico e indiretamente, por meio da secreção de citocinas, as quais levam a liberação de prostaglandinas e/ou ativam o sistema simpático (CUNHA *et alii*, 1991a).

Seguindo esta linha de pensamento, FERREIRA *et alii* (1988), utilizando modelo de hiperalgesia em ratos, verificaram que a IL-1 β , administrada sistemicamente, é um agente hiperalgésico extremamente potente, cerca de 3000 vezes superior a IL-1 α , e que a mesma exerce esse efeito via liberação de metabólitos do ácido araquidônico, mais especificamente, prostaglandinas. Outra citocina que participa da hiperalgesia via ácido araquidônico é a IL-6, a qual libera localmente a IL-1, levando a liberação de prostaglandinas (CUNHA *et alii*, 1992).

O mesmo grupo também demonstrou que a Interleucina 8 (IL-8) induz hiperalgesia, através da ativação do componente simpático, uma vez que tal hiperalgesia, diferentemente do que ocorre com aquela induzida pela IL-1 β , é bloqueada pelo pré-tratamento dos animais com agentes simpatolíticos (guanetidina e propranolol), mas não o é pelo tratamento com indometacina (CUNHA *et alii*, 1991a).

CUNHA *et alii* (1992), em experimentos utilizando anti-soros específicos para várias citocinas, demonstraram que o TNF tem um papel central no desencadeamento da dor inflamatória mediando a liberação das citocinas hiperalgésicas IL-1 e IL-6 que desencadeiam o componente prostaglandínico da hiperalgesia e IL-8 que estimula a liberação de mediadores

simpatomiméticos, os quais ativam o componente simpático do processo. Adicionalmente, demonstrou-se que na hiperalgisia na pata do rato induzida por carragenina, o TNF- α tem um papel fundamental desencadeando uma cascata de citocinas que culminam com a ativação dos 2 componentes da dor inflamatória (CUNHA *et alii*, 1992).

Por outro lado também tem sido demonstrado que a bradicinina parece participar do desencadeamento da hiperalgisia inflamatória, em vários modelos experimentais (STERANKA, MANNING & DEHASS, 1988; COSTELLO & HARGREAVES, 1989; CHAU *et alii*, 1991). Recentemente, um antagonista específico dos receptores BK₂ da bradicinina, HOE 140, foi capaz de inibir o efeito hiperalgésico tardio da bradicinina. Além disso, o HOE 140 produziu analgesia em modelos experimentais de dor inflamatória, particularmente a hiperalgisia provocada por carragenina (BERESFORD & BIRCH, 1992).

FERREIRA, LORENZETTI e POOLE, demonstraram recentemente que a hiperalgisia induzida pela bradicinina era abolida pelo pré-tratamento com anti-soro anti-TNF- α ao passo que aquela provocada pela injeção de TNF- α não era inibida pelo HOE 140, sugerindo que a bradicinina ao induzir TNF- α parece iniciar a cascata de citocinas que participam da mediação da hiperalgisia inflamatória (FERREIRA, LORENZETTI & POOLE, 1993).

Em adição, tem sido mostrado que IL-1 β mas não TNF- α pode induzir hiperalgisia em ratos via ativação de receptores BK₁, tanto aquela provocada por estímulos térmicos (PERKINS & KELLY, 1993) como por estímulos mecânicos (DAVIES & PERKINS, 1993), sugerindo que ambos os tipos de receptores de bradicinina, BK₁ e BK₂, parecem participar da hiperalgisia inflamatória através da ativação de uma complexa rede de interações entre mediadores, na qual a bradicinina pode induzir citocinas e vice-versa.

DRAY & PERKINS, 1993, sugerem que os receptores BK₂ podem ter um papel mais significativo nos estágios iniciais da dor inflamatória, ao passo que os receptores BK₁ participam da manutenção do estado hiperalgésico durante a inflamação e a injúria.

4. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Em face do exposto nos itens anteriores torna-se perfeitamente lícito indagar se, a exemplo do que já havia sido demonstrado para a migração de neutrófilos induzida por mediadores como IL-1, TNF- α , IFN- γ e LTB₄ ou por estímulos inflamatórios tipo LPS, zymosan ou carragenina, teriam os macrófagos residentes um papel mediador central na iniciação de um outro evento como a dor inflamatória?

No intuito de contribuir na resposta a esta pergunta tornaram-se objetivos deste trabalho:

1 - Avaliar a capacidade de macrófagos peritoneais em liberar fatores nociceptivos quando estimulados *in vitro* com LPS;

2 - Na eventualidade destas células secretarem fatores nociceptivos, caracterizá-los farmacologicamente;

3 - Estudar o papel da bradicinina e do seu antagonista HOE 140 sobre a atividade do fator nociceptivo liberado por macrófagos -assim como sobre a atividade nociceptiva de citocinas (IL-1, TNF- α e IL-8);

4 - Estudar o papel de mediadores liberados por macrófagos peritoneais, particularmente citocinas (IL-1, TNF- α e IL-8), na indução da atividade nociceptiva de

agentes como ácido acético, zymosan, carragenina e LPS, usando como modelo experimental o de contorções abdominais em camundongos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

1.1. Ratos

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, pesando de 180 a 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, mantidos em caixas de plástico em salas com controle de temperatura (23-25°C), com livre acesso a ração e água.

1.2. Camundongos

Foram usados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando de 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e do Campus do PICI da Universidade Federal do Ceará, 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, nominados a seguir:

- Agulhas fenestradas;
- Aparelho de ultracentrifugação (Amicon Corporation);
- Autoclave (FABE);

- Balança analítica modelo 2004 MP (Beckman);
- 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);
- Centrífuga Beckman modelo J2-21 (Beckman);
- Estufa de cultura (modelo, 002CB, Fanen Ltda, SP, Brasil);
- Membranas de ultrafiltração Diaflo R YM-10 (Amicon Corporation);
- Microondas (Brastemp);
- Microscópio óptico (Zeiss-Axiovert 10 - Zeiss West Germany);
- pHmetro modelo pHN-4 (Procyon);
- Placas de cultura de Petri (100x15mm) de vidro;
- Seringas de 20 ml, recicladas por autoclavagem;
- Sonicador (Sonics & Materials Inc. Danbury - Connecticut - USA);
- Tubos cônicos de plástico de 13 ml, reciclados por autoclavagem (Corning);
- Tubos Falcon (50 ml) de plástico, reciclados por autoclavagem (Corning).

3. MEIO DE CULTURA, SOLUÇÕES, CORANTES E DROGAS

3.1. Meio de cultura

RPMI 1640 com glutamina sem bicarbonato de sódio, produzido pela Interlab sob licença do Laboratório Flow Ltda. Utilizamos meio com constituição final para 1 litro:

RPMI simples: meio RPMI 1640 Medium (Sigma, St. Louis, USA; 10,4g); bicarbonato de sódio (Merck, Sharp and Dohme - MSD, USA; 2,2g); tampão HEPES (Sigma Chemical Co., USA; 2,381g) e água deionizada Milli-Q, autoclavada (11).

3.2. Soluções

a) Solução de Tioglicolato

Meio de Tioglicolato desidratado (Difco, USA), utilizado a 3%, dissolvido em água deionizada. A solução era aquecida em forno microondas (Brastemp) por 5 minutos e depois resfriada à temperatura ambiente, antes do uso.

b) Salina Tamponada com Fosfato (PBS)

Cloreto de sódio P.A. (Merck)	8,00g
Cloreto de potássio P.A. (Merck)	0,20g
Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck)	1,15g
Fosfato de sódio monobásico P.A. (Merck)	0,20g
Água destilada q.s.p.	1,00l

O pH foi elevado para 7,4 com NaOH 0,1M e a solução autoclavada antes do uso.

c) Solução de LPS

Lipopolissacarídeo, purificado de *E. coli* 0111:B4 - controle 635050 (Difco, USA) - dissolvido em solução de cloreto de sódio a 0,9% numa concentração de 0,025,

0,25, 2,5, 5,0 e 25,0 µg/ml. Antes do uso esta solução era submetida a sonicação por 5 minutos.

d) Solução de Bicarbonato de Sódio

Bicarbonato de Sódio (Merck, Sharp and Dohme, USA), utilizado a 5% (p/v), dissolvido em água deionizada.

e) Solução de Ácido Acético

Ácido Acético Glacial (Merck), utilizado a 0,6% (v/v; 60 mg/kg; concentração de 629 mg/100ml), dissolvido em água deionizada. A solução era diluída conforme a necessidade para obtermos as concentrações de 0,15 e 0,30%.

3.3. Corantes

a) Corante pancrômico de Rosenfeld

Giensa-azul-eosina-azul de metileno	97,0mg
May-Grunwald-eosina-azul de metileno	53,0mg
Metanol P.A. (Merck)	1,0 l

b) Corante de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck)	20,0ml
Azul de metileno	0,5 g
Água destilada	1,0 l

c) Eosina Y a 1%

Eosina Y (Merck).....10,0g

Água destilada.....1,0 l

3.4. Drogas, citocinas e anti-soros

3.4.1. Drogas

a) Acetato de Dexametasona (Decadronal - Merck, Sharp and Dohme - MSD, USA)

- dissolvida em salina.

b) Atenolol (Sigma Chemical Co., USA) - dissolvido em salina.

c) Bradicinina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) - dissolvida em salina e

mantida em tubo escuro em banho de gelo.

d) Carragenina (Viscarin, Marine Colloids, Inc., USA) - dissolvida em salina.

e) Ciclohexemida (Sigma Chemical Co., USA) - dissolvida em salina.

f) Guanetidina (Sigma Chemical Co., USA) - dissolvida em salina.

g) HOE 140 ([D-Arg¹, Thi⁶, (1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolin-2-yl-carbonyl)⁸, ((3as,

7as)-octahydroindol-2-ylcarbonyl)⁹] bradykinin); doado pela Hoechst AG, Frankfurt,

Germany) - dissolvido em salina.

h) Iloprost (ZK 36374; Schering AG) - dissolvido em salina.

i) Indometacina (lote - PRF 619; Merck, Sharp and Dohme - MSD, USA) -

dissolvida em bicarbonato de sódio a 5%.

j) Paracetamol (Sigma Chemical Co., USA) - dissolvido em salina.

l) Sulfato de polimixina B - gentilmente cedida pela Wellcome Brasil. Dissolvida em PBS, dependendo do uso.

m) Zymosan (from *Saccharomyces cerevisiae*; lot 101H0211; Sigma Chemical Co., St Louis, USA) - dissolvido em salina.

3.4.2. Citocinas recombinantes

a) Interleucina-1 β recombinante humana (rhuIL-1 β): 1 $^{\circ}$ padrão internacional (código 86/680 NIBSC) obtida do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Inglaterra, através do Dr. Steeve Poole. Cada ampola continha 100.000 UI/ μ g de proteína, de atividade específica.

b) Fator de necrose tumoral- α recombinante humano (rhuTNF- α): também obtido do NIBSC; código 87/650. Cada ampola continha 40.000 UI/ μ g de proteína, de atividade específica.

c) Interleucina-8 recombinante humana (rhuIL-8): também foi obtida do NIBSC, através do Dr. Steeve Poole; código 89/520. Cada ampola continha 1 μ g de proteína.

Todas as citocinas acima foram gentilmente cedidas pelo Prof. Sérgio Henrique Ferreira do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.4.3. Anti-soros específicos

Os anti-soros anti-rhuIL-1 β , anti-rmuTNF- α e anti-rhuIL-8, e o soro controle (n^o 5491), foram todos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Steeve Poole, do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Inglaterra.

4. OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS

Todas as etapas que serão descritas referentes à cultura de macrófagos foram realizadas em condições assépticas, utilizando-se para isto uma capela de fluxo laminar vertical. Os materiais utilizados foram autoclavados a 127°C durante 1 hora.

4.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram obtidos de cavidades peritoneais de ratos que receberam 4 dias antes, 10 ml de uma solução de tioglicolato a 3% (p/v), por via intraperitoneal. Para coleta dos macrófagos, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, submetidos a assepsia com álcool iodado e imediatamente injetados, por via intraperitoneal, 10 ml de meio de cultura RPMI (Difco) pH 7,4, contendo heparina (5 U.I./ml de meio). Após leve massagem retirou-se o maior volume possível do lavado com auxílio de seringas e agulhas apropriadas, fenestradas de aço inoxidável 30 x 18 mm.

4.2. Estimulação *in vitro* dos macrófagos com LPS

Os lavados peritoneais foram distribuídos em placas de Petri de vidro, as quais foram incubadas a 37°C durante 1 hora, a fim de que os macrófagos pudessem aderir ao fundo das mesmas. Os sobrenadantes foram desprezados e as células aderidas, lavadas com PBS. Este procedimento elimina a grande maioria das demais células presentes no lavado, visto que normalmente elas não aderem.

Os macrófagos aderidos eram estimulados com LPS na dose de 5 µg/ml de meio (RPMI) durante 30 minutos a 37°C. Ao final da incubação, a solução contendo LPS era desprezada, as células lavadas novamente com PBS (3x) e incubadas com 5,0 ml de RPMI por 1 hora a 37°C para extração do sobrenadante de cultura de macrófagos (MNF).

Os sobrenadantes de cultura de macrófagos eram então reunidos e centrifugados a 200 x g por 10 minutos e a viabilidade celular observada pela técnica de exclusão pela eosina Y.

Da mesma forma procedíamos para obtenção de monocamadas de macrófagos normais, com exceção de que, neste caso, não estimulávamos os macrófagos com LPS.

4.3. Obtenção dos sobrenadantes para o teste

Os sobrenadantes foram obtidos da forma descrita acima e ao final eram submetidos a ultrafiltração em membrana Amicon YM-10 e o material retido na mesma ressuspensão em PBS estéril a 1/10 do volume original ou na concentração desejada de acordo com o experimento.

Nestas condições, o laboratório de Inflamação de Ribeirão Preto, observou que a atividade nociceptiva presente no sobrenadante de macrófagos, não é devida a presença de LPS, visto que o mesmo perdeu sua atividade quando incubado com polimixina B, fato este não observado com o MNF (CAMPOS, 1990).

5. TESTE NOCICEPTIVO

A atividade algogênica do fator nociceptivo secretado por macrófagos (MNF) foi testada em camundongos no modelo de contorções abdominais (COLLIER *et alii*, 1968). Para este propósito foi injetado 0,01 ml/g de peso da solução de MNF na cavidade peritoneal destes animais testes. A intensidade da nocicepção neste caso foi quantificada por contagem do número total de contorções ocorridas nos primeiros 50 minutos após a injeção de MNF. A partir da obtenção da faixa de detecção temporal da atividade nociceptiva do MNF, o número de contorções passou a ser quantificado entre o 14º e o 34º minutos. Para os outros estímulos (zymosan, carragenina, ácido acético e LPS) a observação foi realizada até o 40º minuto após injeção i.p. dos mesmos.

6. EFEITO DE DIFERENTES DROGAS SOBRE A LIBERAÇÃO E SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO MNF

Os efeitos da indometacina (10^{-5} M e 10^{-4} M; CAMPOS, 1990), paracetamol (10^{-4} M; CAMPOS, 1990), dexametasona (10^{-5} M; CAMPOS, 1990) e ciclohexemida (10^{-5} M e 3×10^{-5} M; CAMPOS, 1990) foram avaliados em camundongos.

⁵M; CAMPOS, 1990) sobre a liberação de MNF *in vitro* foi testado por adição destas drogas na incubação, 30 minutos antes do estímulo com LPS das monacamadas de macrófagos. Durante o período de estimulação com LPS assim como durante o período de incubação, as drogas também estiveram presentes. Para avaliar o possível efeito destas drogas na resposta nociceptiva, elas foram adicionadas ao líquido de incubação dos controles, permanecendo até o final da incubação.

Os efeitos da indometacina (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 minutos antes; CAMPOS, CUNHA & FERREIRA, 1988), paracetamol (100 e 200 mg/kg; 30 minutos antes; CAMPOS, 1990), atenolol (0,5 mg/kg; 30 minutos antes) e dexametasona (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 minutos antes; CAMPOS, 1990), sobre a nocicepção induzida pelo MNF foram testados, tratando-se os animais com injeção s.c.. Para investigar o efeito da guanetidina (30 mg/kg; DUARTE, NAKAMURA & FERREIRA, 1988) sobre a atividade do MNF, os animais foram pré-tratados diariamente por injeção s.c. durante 3 dias consecutivos antes da injeção do MNF.

7. EFEITO DOS SOROS ANTI-CITOCINAS SOBRE A ATIVIDADE DO MNF

Os anti-soros (50 µl; anti-rhuIL-1 β , anti-rmuTNF- α e anti-rhuIL-8) e o soro controle (50 µl), além do veículo de injeção (salina), foram incubados com MNF (10 vezes concentrado) por 10 minutos à temperatura ambiente antes da injeção (i.p.; 0,01 ml/g de peso) da mistura nos animais testes e seus efeitos observados no modelo de contorções abdominais.

8. EFEITO NOCICEPTIVO DO TNF- α , IL-1 β E IL-8

TNF- α (0,5-100,0 ng/animal), IL-1 β (0,005-100,0 ng/animal) e IL-8 (0,1-50,0 ng/animal), além de uma mistura de citocinas (100 ng/animal de IL-1 + 50 ng/animal de IL-8 + 100 ng/animal de TNF; diluições 1/9, 1/3 e 1/1), foram injetados i.p. (0,01 ml/g de peso) em camundongos teste e o número de contorções foi determinado entre o 14° e 34° minuto após a injeção. A faixa de doses utilizada baseou-se em dados referentes a atividade destas citocinas no teste de hiperalgesia na pata de ratos (CUNHA *et alii*, 1992).

9. EFEITO DO HOE 140 E DA BRADICININA SOBRE A ATIVIDADE DA MISTURA DE CITOCINAS E DO MNF

Para se avaliar o efeito do HOE 140 (5 mg/kg) e da bradicinina (20 μ g/animal) sobre a atividade nociceptiva da mistura de citocinas (diluições 1/3 e 1/1; i.p.; 0,01 ml/g de peso) e do MNF (10 vezes concentrado; i.p.; 0,01 ml/g de peso), os animais foram tratados com injeção i.p. (0,01 ml/g de peso) de HOE 140, 30 min antes, e de bradicinina, 5 minutos depois da injeção dos estímulos. Nos baseamos no trabalho de FERREIRA, LORENZETTI e POOLE (1993) para utilizarmos estas doses.

10. ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN, CARRAGENINA, ÁCIDO ACÉTICO E LPS

A atividade nociceptiva do zymosan (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal; RAO *et alii*, 1994), carragenina (0,125, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal), ácido acético (0,15, 0,30 e 0,60%; DUARTE, NAKAMURA & FERREIRA, 1988) e LPS (0,025, 0,25, 2,5 e 25,0 µg/ml; CAMPOS, 1990) foi testada no modelo de contorções abdominais em camundongos após injeção intraperitoneal de 0,01 ml/g de peso. A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções apresentadas até 40 minutos após injeção dos estímulos.

11. EFEITO DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS RESIDENTES NAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ZYMOSAN, CARRAGENINA, ÁCIDO ACÉTICO E LPS

11.1. Lavagem da cavidade peritoneal de camundongos

Os animais eram anestesiados com éter e com o auxílio de uma agulha fenestrada pequena (de aço inoxidável 40 x 12 mm, adaptada em oficina para agulha 20 x 12 mm, na qual foi feita orifícios), colocada na altura do esterno, suas cavidades peritoneais recebiam 10 ml de salina estéril. Após leve massagem, a salina era recuperada (\pm 8 ml) com o auxílio de 2 outras agulhas fenestradas pequenas, colocadas na altura da região inguinal. Este procedimento era

repetido mais 2 vezes. Após 30 minutos de recuperação os animais eram utilizados no teste de contorções abdominais.

11.2. Contagem total e diferencial do número de células

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas cavidades peritoneais lavadas com 5 ml de PBS + heparina (5 U.I./ml de PBS) + albumina 3 % (1 ml/100 ml de PBS) para obtenção do exsudato peritoneal. Os exsudatos foram recolhidos e colocados em tubos identificados.

Em outros tubos, também identificados, 180 µl de Turk foi colocado, e a seguir adicionados 20 µl do exsudato. A contagem global foi feita em câmara de Neubauer, com fator de correção igual a 25 (2,5 da câmara e 10 da diluição). O restante do exsudato foi centrifugado por 5 minutos a 200 x g. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se albumina 3 % ao sedimento de células. Os sedimentos de células foram ressuspensos em 100 µl de albumina. Lâminas foram feitas para contagem diferencial.

11.3. Atividade nociceptiva do zymosan, carragenina, ácido acético e LPS em animais previamente lavados

Após a lavagem da cavidade abdominal dos camundongos, conforme descrito no item 11.1., testou-se o efeito do zymosan (1,0 mg/animal; i.p.), carragenina (1,0 mg/animal; i.p.), ácido acético (0,6%; i.p.) ou LPS (0,25 µg/ml; i.p.) sobre as contorções abdominais de animais com cavidade depletada de células e de animais controles . Como controle positivo

utilizamos o Iloprost (50 µg/kg), um derivado carbocíclico estável da prostaciclina - PGI₂, capaz de provocar contorções abdominais.

12. EFEITO DO AUMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES NAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ZYMOSAN E ÁCIDO ACÉTICO

12.1. Tratamento dos animais com tioglicolato

Os camundongos recebiam 4 dias antes do estímulo (zymosan ou ácido acético) uma solução de tioglicolato a 3% (p/v; 3 ml) por via intraperitoneal, o qual reconhecidamente, aumenta o número de macrófagos de forma bastante significativa, no tempo avaliado (4 dias).

12.2. Contagem total e diferencial do número de células

O procedimento utilizado aqui foi o mesmo descrito anteriormente no item 11.2..

12.3. Atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético em animais pré-tratados com tioglicolato

O efeito da injeção de zymosan (1,0 mg/animal; i.p.) e de ácido acético (0,3 e 0,6%; i.p.) em cavidades abdominais de animais pré-tratados com tioglicolato (3%; 3 ml; 4 dias antes)

foi avaliado no modelo de contorções abdominais para verificar a participação de células residentes.

13. EFEITO DA DEXAMETASONA NAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ZYMOSAN, ÁCIDO ACÉTICO E LPS

Avaliamos o efeito da administração subcutânea da dexametasona (1 mg/kg; 0,1 ml em salina), 30 minutos antes dos estímulos zymosan (1,0 mg/animal; i.p.), ácido acético (0,6%; i.p.) ou LPS (0,25 µg/ml; i.p.) no modelo de contorções abdominais em camundongos.

14. EFEITO DA INDOMETACINA, ATENOLOL E GUANETIDINA SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ZYMOSAN E ÁCIDO ACÉTICO

Os efeitos da indometacina (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), atenolol (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), guanetidina (30 e 50 mg/kg; 3 dias consecutivos), e associação de indometacina (0,5 mg/kg) com atenolol (0,5 mg/kg) e indometacina (0,5 mg/kg) com guanetidina (30 mg/kg) foram testados sobre a atividade nociceptiva induzida pelo zymosan (1,0 mg/animal; i.p.; 0,01 ml/g de peso) e pelo ácido acético (0,6%; i.p.; 0,01 ml/g de peso), tratando-se os animais com injeções subcutâneas (0,1 ml/animal).

15. EFEITO DOS SOROS ANTI-CITOCINAS SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOZAN, CARRAGENINA E ÁCIDO ACÉTICO

Os anti-soros (50 μ l; anti-rmuTNF- α , anti-rhuIL-1 β e anti-rhuIL-8) e o soro controle (50 μ l), além do veículo de injeção (salina), foram injetados intraperitonealmente (0,1 ml) e após 10 minutos, os mesmos animais receberam uma solução de zymosan (1,0 mg/animal; i.p.; 0,01 ml/g de peso), carragenina (1,0 mg/animal; i.p.; 0,01 ml/g de peso) ou ácido acético (0,6%; i.p.; 0,01 ml/g de peso).

16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos resultados obtidos foram aplicados tratamentos estatísticos para determinação das médias, dos desvios padrões e erros padrões das médias (EPM). Para comparações entre grupos, os seguintes testes estatísticos foram utilizados para determinação dos índices de significância ($p < 0,05$, no mínimo):

a) O teste t de Student para amostras pareadas (SNEDECOR, 1963);

b) A análise de variância (ANOVA), para comparação de variáveis independentes.

Nos casos em que os valores de F obtidos foram maiores que $F_{0,05}$ crítico, a comparação para determinação de diferenças estatisticamente significativas entre várias médias foi feita utilizando-se o teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

III. RESULTADOS

1. LIBERAÇÃO POR MACRÓFAGOS DE UM FATOR COM ATIVIDADE NOCICEPTIVA

Macrófagos de ratos, provenientes de cavidades peritoneais, previamente elicitados com tioglicolato (3%, 10 ml, 4 dias antes), quando estimulados *in vitro* com LPS (5 µg/ml), liberam no sobrenadante de cultura um(s) fator(es) capaz(es) de induzir o aparecimento de contorções abdominais em camundongos. A esta atividade chamamos de Fator Nociceptivo Secretado por Macrófagos (MNF). Na figura 1A observa-se que, monocamadas de macrófagos quando incubadas apenas com meio de cultura RPMI ou com este e estimuladas com LPS mas colocadas em banho de gelo (4°C) não foram capazes de liberar tal fator (MNF) no sobrenadante da cultura. Nota-se que apenas monocamadas de macrófagos estimuladas com LPS e incubadas a 37°C foram efetivas em induzir de forma significativa a liberação desta atividade nociceptiva ($p < 0,01$).

Após a injeção intraperitoneal do MNF observa-se uma atividade nociceptiva que se inicia por volta do 14^o min, é máxima entre o 18^o e o 26^o min, e decai por volta do 40^o min de observação (Figura 1B). Observa-se ainda que esta atividade é mais intensa quando o material retido na membrana de ultrafiltração YM-10 é ressuspenso em um determinado volume de salina estéril e concentrado 10 vezes (Figura 1B superior). Portanto, a partir deste experimento, sempre observamos a atividade do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS (MNF - concentrado 10 vezes) do 14^o ao 34^o minuto após sua injeção i.p. (0,01 ml/g de peso). É importante lembrar que a membrana de ultrafiltração utilizada para reter este material descarta moléculas de peso molecular abaixo de 10 KDa concentrando as de peso molecular acima deste valor.

2. INIBIÇÃO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO DO MNF

O tratamento *in vitro* das monocamadas de macrófagos com ciclohexemida, inibidor de síntese protéica (CHX; 10^{-5} e 3×10^{-5} M), ou com a dexametasona, glicocorticóide (DEXA; 10^{-5} M), bloqueou significativamente (48,72% e 56,34% - CHX e 76,44% - DEXA; $p < 0,05$) a secreção do MNF estimulada pelo LPS, sendo que o mesmo não foi observado com o tratamento das monocamadas de macrófagos com indometacina (INDO; 10^{-5} e 10^{-4} M) e paracetamol (Ptol; 10^{-4} M), inibidores da ciclooxigenase (Figura 2).

3. BLOQUEIO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO MNF

A administração subcutânea de indometacina (INDO; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), paracetamol (Ptol; 100 e 200 mg/kg; 30 min antes) ou dexametasona (DEXA; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes) em camundongos, inibiu (70,97% e 98,18% - INDO, 38,36% e 94,72% - Ptol e 62,03% e 75,25% - DEXA, respectivamente; $p < 0,05$) a nocicepção induzida por MNF (Figura 3A). O painel B da mesma figura mostra que os bloqueadores simpáticos, guanetidina (Gua; 30 mg/kg; 3 dias consecutivos) e atenolol (Atn; 0,5 mg/kg; 30 min antes), inibiram parcialmente (30,84% e 44,82%, respectivamente) o efeito nociceptivo do MNF (i.p.; 0,01 ml/g de peso) quando administrados por via s.c.: ($p < 0,05$ para o Atn). Entretanto, a associação de guanetidina ou atenolol com uma dose de indometacina (0,5 mg/kg), que também inibiu parcialmente a atividade do MNF, aboliu o efeito nociceptivo do MNF (98,50% e 96,31%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 3C).

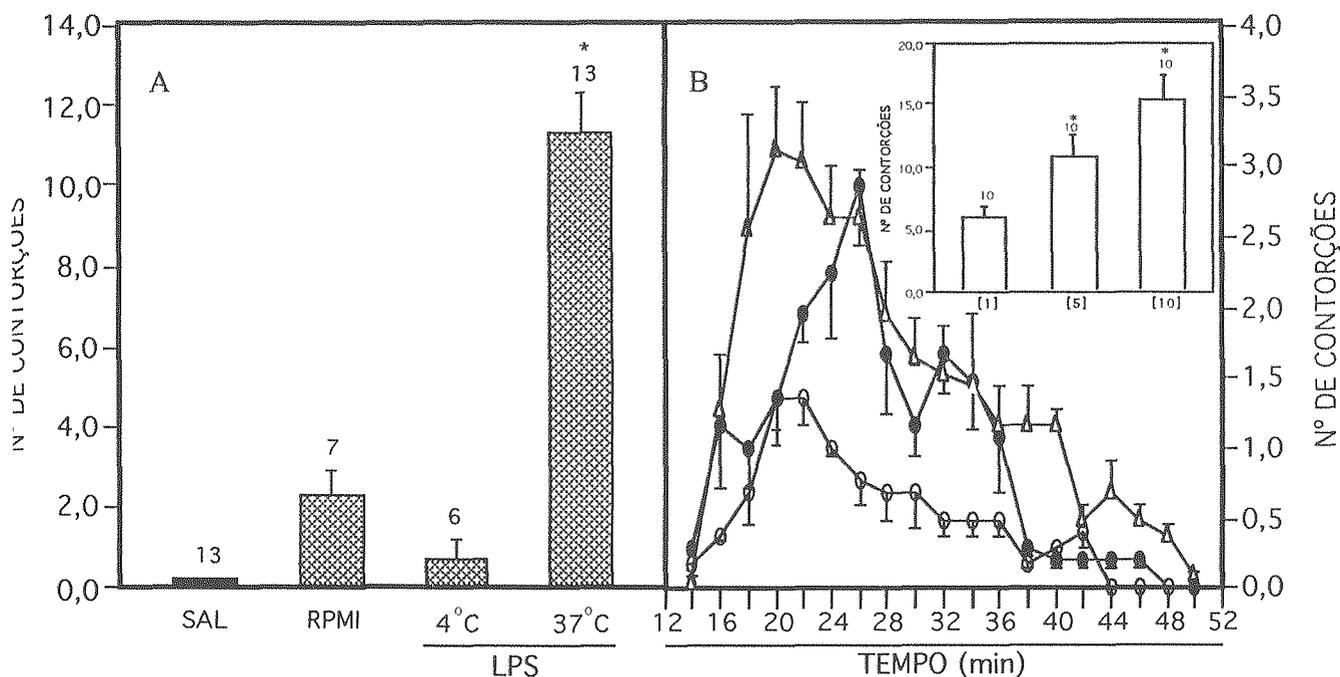


FIGURA 1. Atividade nociceptiva do sobrenadante de monocamadas de macrófagos estimuladas ou não com LPS. O painel A mostra o número de contorções abdominais induzidas pela injeção do sobrenadante de monocamadas de macrófagos (i.p.; 0,01 ml/g de peso) estimulados por 30 min com LPS (5 µg/ml) e incubadas a 4°C ou a 37°C, monocamadas de macrófagos incubadas somente com meio fresco (RPMI) ou induzidas pela injeção de salina (SAL). O painel B mostra o curso temporal das contorções abdominais induzidas pela injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS e incubados a 37°C (Fator Nociceptivo Secretado por Macrófagos-MNF), em 3 diferentes concentrações: (○) concentrado 1x, (●) concentrado 5x e (Δ) concentrado 10x, no intervalo de 14 a 50 min após injeção i.p.. A parte superior deste painel mostra o n° de contorções acumuladas após injeção i.p. do MNF em 3 diferentes concentrações: 1x, 5x e 10x concentrado. O número acima de cada barra representa o número de animais ensaiados. As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas entre o 14^o e 34^o minuto. (*)p<0,01 em relação ao grupo controle (SAL). ANOVA e Teste de Bonferroni.

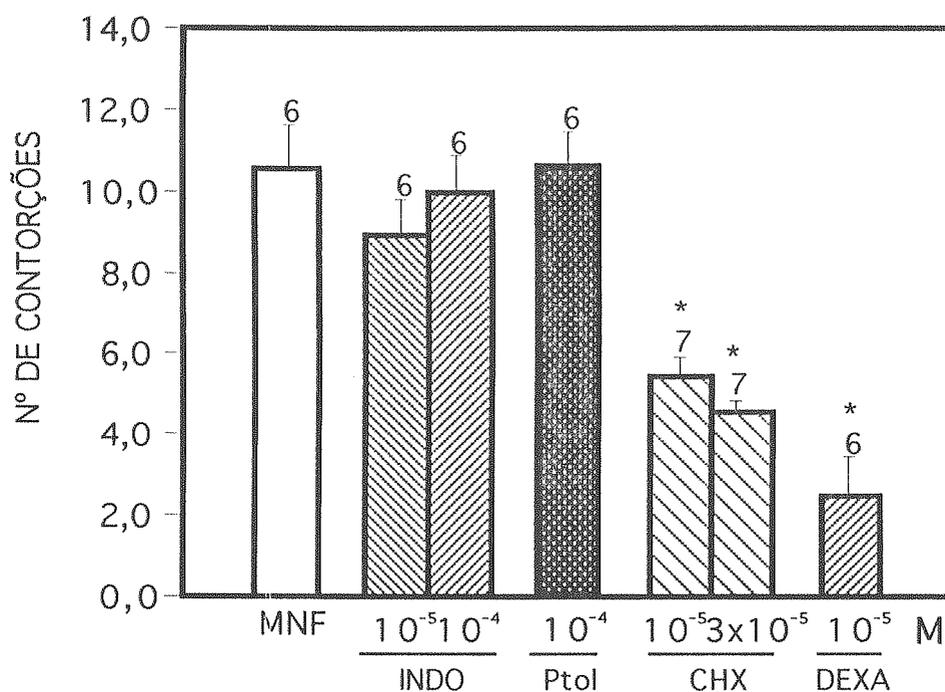


FIGURA 2. Efeito *in vitro* da indometacina, paracetamol, ciclohexemida e dexametasona na detecção *in vivo* da atividade do Fator Nociceptivo-MNF liberado por monocamadas de macrófagos estimuladas com LPS. O painel mostra o número de contorções induzidas pela injeção de MNF (0,01 ml/g de peso; i.p.) liberado por monocamadas de macrófagos estimuladas com LPS (5µg/ml) na ausência, MNF (controle), ou na presença de indometacina (INDO- 10^{-5} e 10^{-4} M), paracetamol (Ptol- 10^{-4} M), ciclohexemida (CHX- 10^{-5} e 3×10^{-5} M) ou dexametasona (DEXA- 10^{-5} M). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas entre o 14º e 34º minuto após injeção de MNF. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (MNF). ANOVA e Teste de Bonferroni.

4. ENVOLVIMENTO DE CITOCINAS NA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO MNF

A figura 4 mostra que a pré-incubação (10 minutos à temperatura ambiente) do MNF com anti-soros específicos (50 μ l) anti-IL-8, anti-IL-1 β ou anti-TNF- α , parcialmente inibiu a atividade nociceptiva (34,48%, 50,17% e 60,06%, respectivamente; $p < 0,05$ - IL-8 e $p < 0,001$ - IL-1 e TNF) do MNF.

Observamos também que a resposta nociceptiva da mistura de citocinas (50 ng de IL-8 + 100 ng de IL-1 + 100 ng de TNF/animal; 0,01 ml/g de peso; diluições 1/9, 1/3 e 1/1) é mais potente ($p < 0,01$ na diluição 1/1) que a resposta nociceptiva destas mesmas citocinas isoladamente, TNF (0,5-100 ng/animal), IL-1 (0,005-100 ng/animal) e IL-8 (0,1-50 ng/animal) após injeção intraperitoneal (Figura 5).

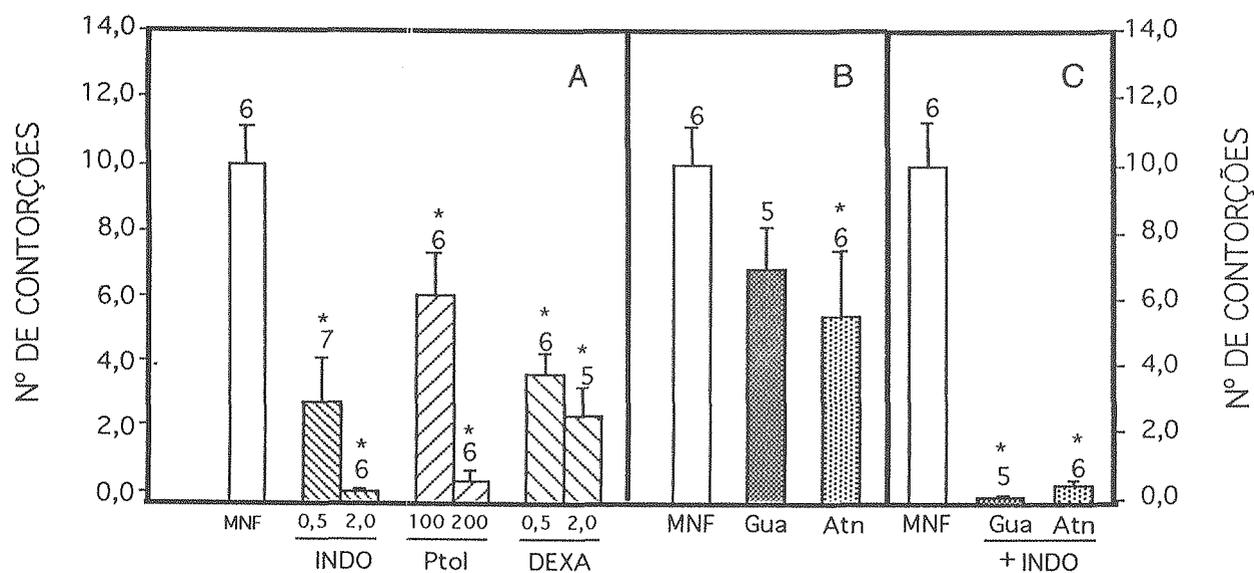


FIGURA 3. Efeito da indometacina, paracetamol, dexametasona, guanetidina e atenolol sobre as contorções induzidas pelo MNF. O painel A mostra o número de contorções induzidas pela injeção de MNF (0,01 ml/g de peso; i.p.) em animais não tratados (MNF), e em animais pré-tratados por injeção s.c. de indometacina (INDO; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), paracetamol (Ptol; 100 e 200 mg/kg; 30 min antes) ou dexametasona (DEXA; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes). O painel B mostra o número de contorções induzidas pela injeção de MNF em animais não tratados (MNF) e em animais pré-tratados por injeção s.c. de guanetidina (Gua; 30 mg/kg/3 dias seguidos) ou por atenolol (Atn; 0,5 mg/kg; 30 min antes). O painel C mostra o número de contorções induzidas pela injeção de MNF em animais não tratados (MNF) e naqueles pré-tratados por injeção s.c. de guanetidina (Gua; 30 mg/kg/3 dias seguidos) associado a indometacina (INDO; 0,5 mg/kg; 30 minutos antes) ou de atenolol (Atn; 0,5 mg/kg; 30 minutos antes) associado a indometacina (INDO; 0,5 mg/kg; 30 min antes). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas entre 14^o e 34^o min após a injeção do estímulo. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados naquele grupo. (*) $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controles. ANOVA e Teste de Bonferroni.

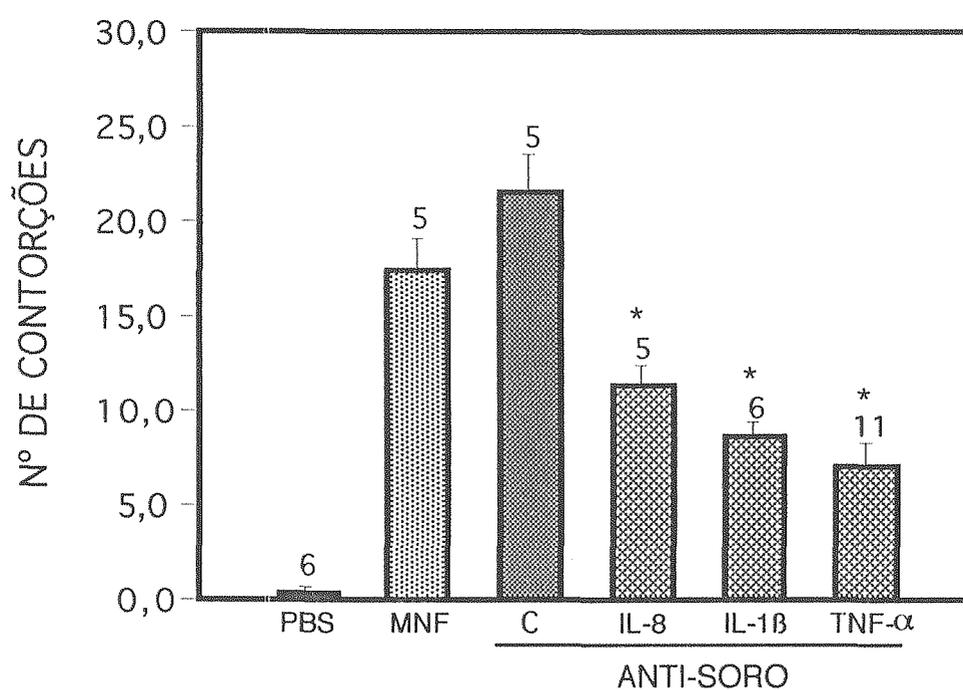


FIGURA 4. Efeito dos soros anti-citocinas sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de MNF. As contorções foram induzidas pela injeção i.p. de PBS ou de MNF (0,01 ml/g de peso) isolado ou MNF pré-incubado 10 min antes com soro anti-IL-8 (50µl), soro anti-IL-1β (50µl), soro anti-TNF-α (50µl) ou soro controle (C). As barras representam a média ± EPM do número total de contorções ocorridas entre o 14^o e 34^o min após a injeção do estímulo. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (MNF). ANOVA e Teste de Bonferroni.

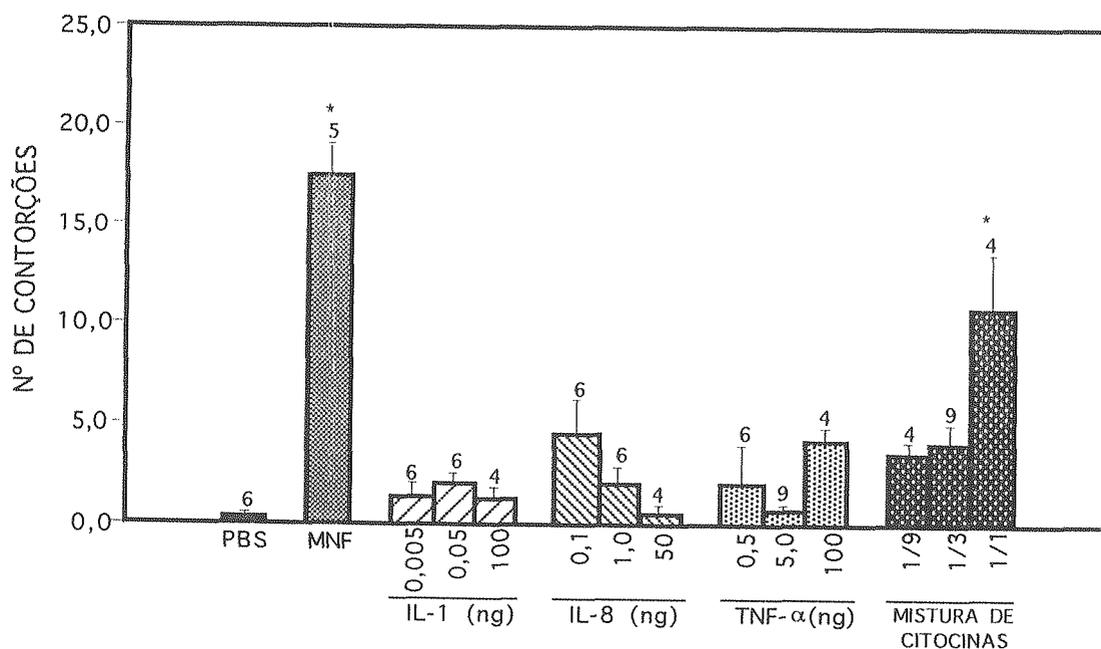


FIGURA 5. Efeito de citocinas na indução de contorções abdominais. PBS, MNF e diferentes doses de citocinas (ng/cavidade) isoladas ou associadas (mistura de citocinas/cavidade: IL-1-100ng + IL-8-50ng + TNF- α -100ng, em 3 diluições, 1/1, 1/3 e 1/9) foram administradas intraperitonealmente (0,01 ml/g de peso) e o número total de contorções ocorridas entre o 14^o e 34^o min após a injeção dos estímulos foi computado. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (PBS). ANOVA e Teste de Bonferroni.

5. EFEITO DO HOE 140 SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DA MISTURA DE CITOCINAS E DO MNF E DA BRADICININA SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DA MISTURA DE CITOCINAS

A administração intraperitoneal de HOE 140 (5 mg/kg; 30 minutos antes) em camundongos inibiu (94,69%; $p < 0,05$) o efeito amplificador (216,30%; $p < 0,01$) da bradicinina (BK; 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$; 5 minutos depois; i.p.) sobre as contorções induzidas pela mistura de citocinas (IL-1, IL-8 e TNF- α ; diluição 1/3). O HOE também foi capaz de inibir a atividade nociceptiva da mistura de citocinas (diluição 1/1; 66,03%; $p < 0,05$) e a atividade nociceptiva do MNF (46,67%; $p < 0,01$), de forma significativa (Figura 6). Torna-se importante salientar que a bradicinina sozinha, administrada intraperitonealmente (0,01 ml/g de peso) nas doses de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$, não foi capaz de provocar contorções abdominais em camundongos (Tab.1).

TABELA 1 -EFEITO DOSE-RESPOSTA DA BRADICININA NA INDUÇÃO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

ESTÍMULO	Nº DE CONTORÇÕES
VEÍCULO (6)	0,50 \pm 0,22
BK - 1 μg (6)	0,17 \pm 0,17 (NS)
BK - 10 μg (8)	0,33 \pm 0,33 (NS)
BK - 100 μg (8)	0,67 \pm 0,49 (NS)

Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de contorções abdominais de um número variável de animais, indicados entre parênteses, por grupo, observados do 14º ao 34º min após injeção i.p. da bradicinina.

(NS) - Não significativo - ANOVA - Teste de Bonferroni.

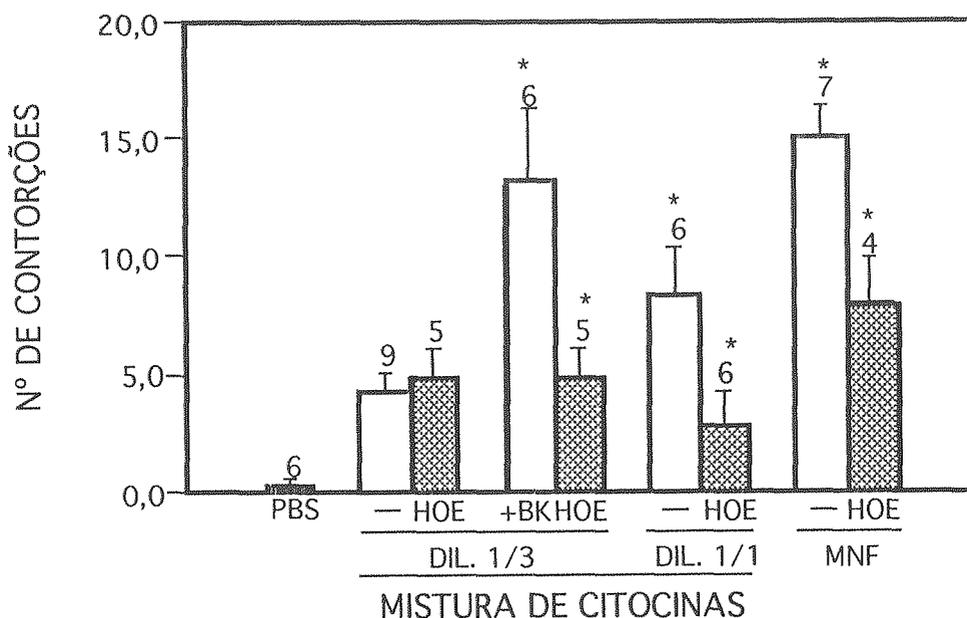


FIGURA 6. Efeito do HOE 140 e da bradicinina sobre as contorções abdominais induzidas pela mistura de citocinas e pelo MNF. HOE 140 (5 mg/kg) foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso) 30 min antes da injeção da mistura de citocinas (mistura de citocinas/cavidade: IL-1 - 100ng + IL-8 - 50ng + TNF- α - 100ng em duas diluições, 1/1 e 1/3) e do MNF (0,01 ml/g de peso). Bradicinin (BK; 20 μ g/animal; i.p.) foi administrado (0,01 ml/g de peso) 5 min após a injeção da mistura de citocinas. -As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas entre o 14^o e 34^o min após o estímulo com a mistura de citocinas, o MNF ou PBS (controle). Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS). ANOVA e Teste de Bonferroni.

6. ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOBAN, DA CARRAGENINA, DO ÁCIDO ACÉTICO E DO LPS

A injeção intraperitoneal (0,01 ml/g de peso) do zymosan (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal), da carragenina (0,125, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal), do ácido acético (0,15, 0,30 e 0,60%) e do LPS (0,025, 0,25, 2,5 e 25,0 µg/ml) foi capaz de induzir contorções abdominais em camundongos de forma dose-dependente quando os animais são observados por 40 minutos após os estímulos (Figuras 7, 8, 9 e 10). Nota-se ainda que esta atividade nociceptiva é máxima com o uso da dose de 1 mg/animal de zymosan ($p < 0,001$), 1 mg/animal de carragenina ($p < 0,02$), 0,6% de ácido acético ($p < 0,001$) e 0,25 µg/ml de LPS ($p < 0,001$). Interessante observar que, com exceção do ácido acético, os demais estímulos quando testados em doses acima daquelas que induziram seus respectivos efeitos máximos, mostraram respostas da mesma magnitude daquelas observadas com doses pouco efetivas, o que caracteriza típicas curvas “em sino”.

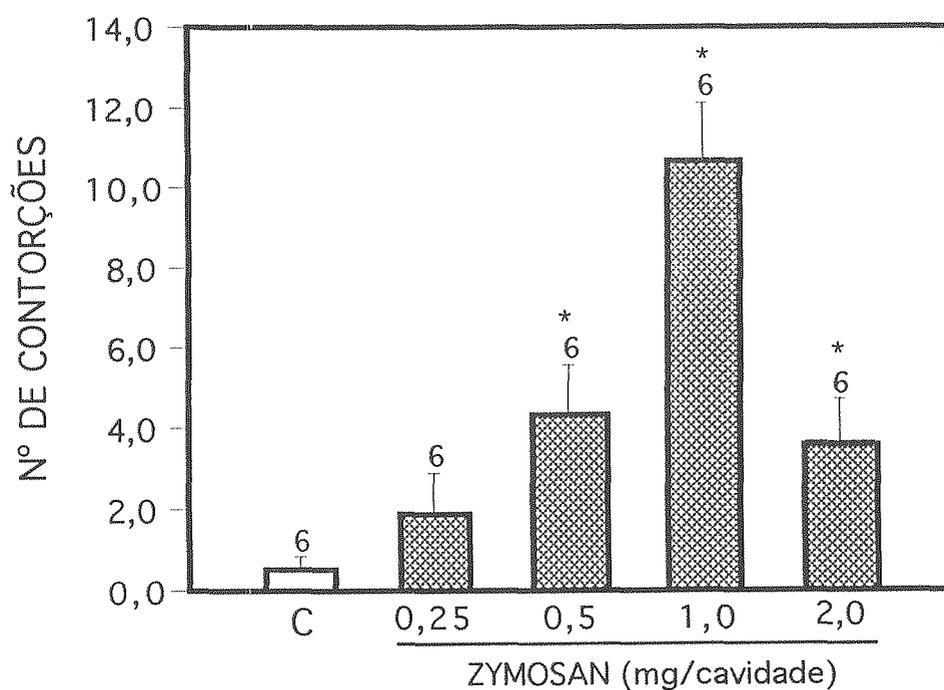


FIGURA 7. Efeito dose-resposta do zymosan na indução de contorções abdominais. Zymosan, nas doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal, foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso), sendo o veículo de injeção, PBS, usado como controle (C). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^omin após injeção do zymosan ou PBS. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,02$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student.

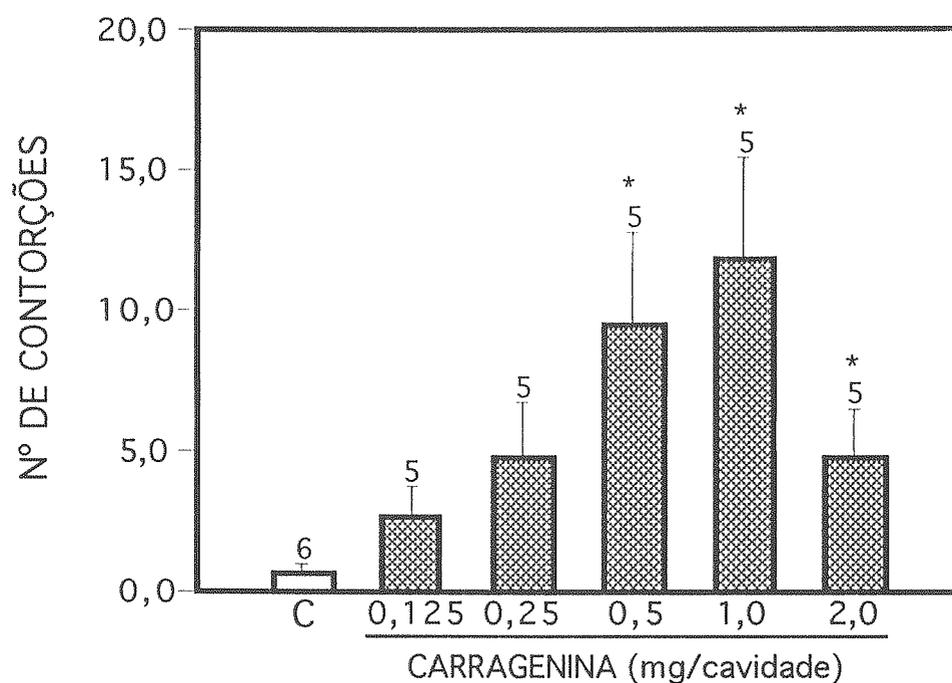


FIGURA 8. Efeito dose-resposta da carragenina na indução de contorções abdominais. Carragenina, nas doses de 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/animal, foi administrada i.p. (0,01 ml/g de peso), sendo o veículo de injeção, PBS, usado como controle (C). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção de carragenina ou PBS. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student.

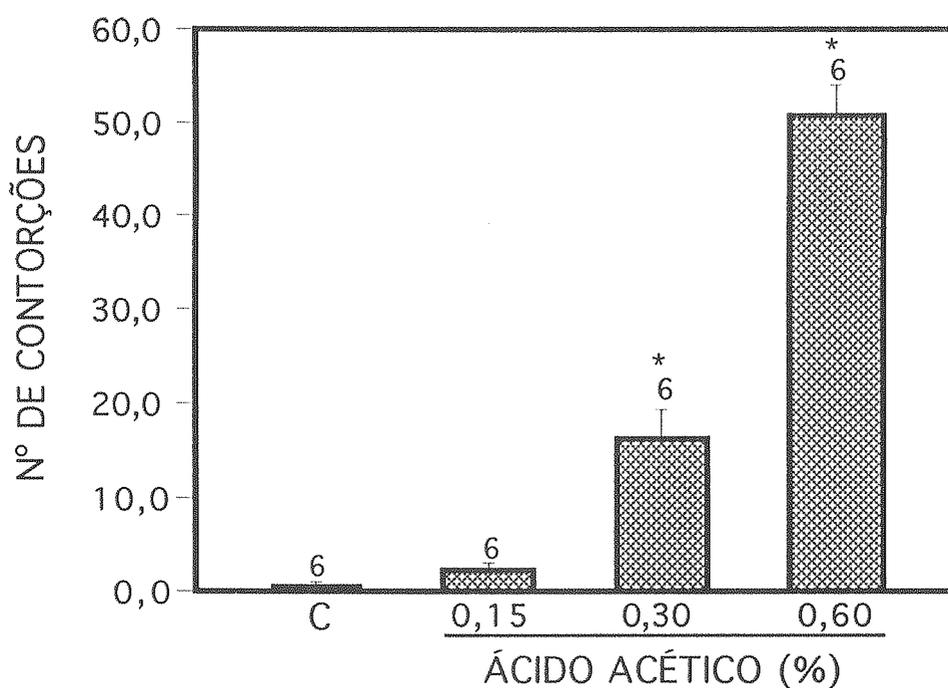


FIGURA 9. Efeito de diferentes concentrações de ácido acético na indução de contorções abdominais. Ácido acético, nas concentrações de 0,15, 0,30 e 0,60%, foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso), sendo o veículo de injeção, PBS, usado como controle (C). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o-min após injeção de ácido acético ou PBS. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student.

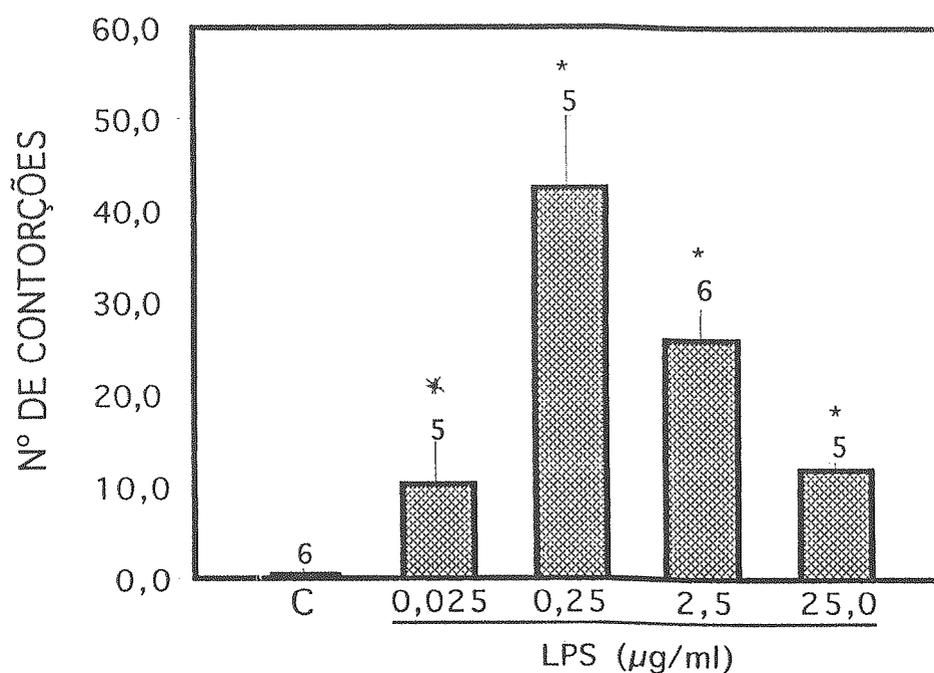


FIGURA 10. Efeito dose-resposta do LPS na indução de contorções abdominais. LPS, nas doses de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/ml, foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso), sendo o veículo de injeção, PBS, usado como controle (C). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção de LPS ou PBS. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student.

7. EFEITO DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS RESIDENTES NA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ILOPROST, DO ZYMOSEAN, DO ÁCIDO ACÉTICO, DA CARRAGENINA E DO LPS

A lavagem peritoneal de camundongos, descrita no item II. 11., reduziu de forma bastante significativa o número de macrófagos residentes (84,52%; $p < 0,001$) (Figuras 11A e 12A). Animais cujas cavidades peritoneais foram previamente lavadas (30 min antes) receberam então injeção intraperitoneal (0,01ml/g de peso) de iloprost (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - Figuras 11B e 12B), de zymosan (1 mg/animal - Figura 11C) e de ácido acético (0,6% - Figura 11D), além de carragenina (1 mg/animal - Figura 12C) e de LPS (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - Figura 12D). Observou-se que o Iloprost não teve seu efeito alterado com a lavagem prévia das cavidades abdominais dos animais, comportando-se portanto como controle positivo do procedimento; já o zymosan (70,01%; $p < 0,001$), o ácido acético (86,90%; $p < 0,001$), a carragenina (90,08%; $p < 0,02$) e o LPS (91,04%; $p < 0,001$), apresentaram uma queda significativa nas suas atividades nociceptivas em animais previamente lavados.

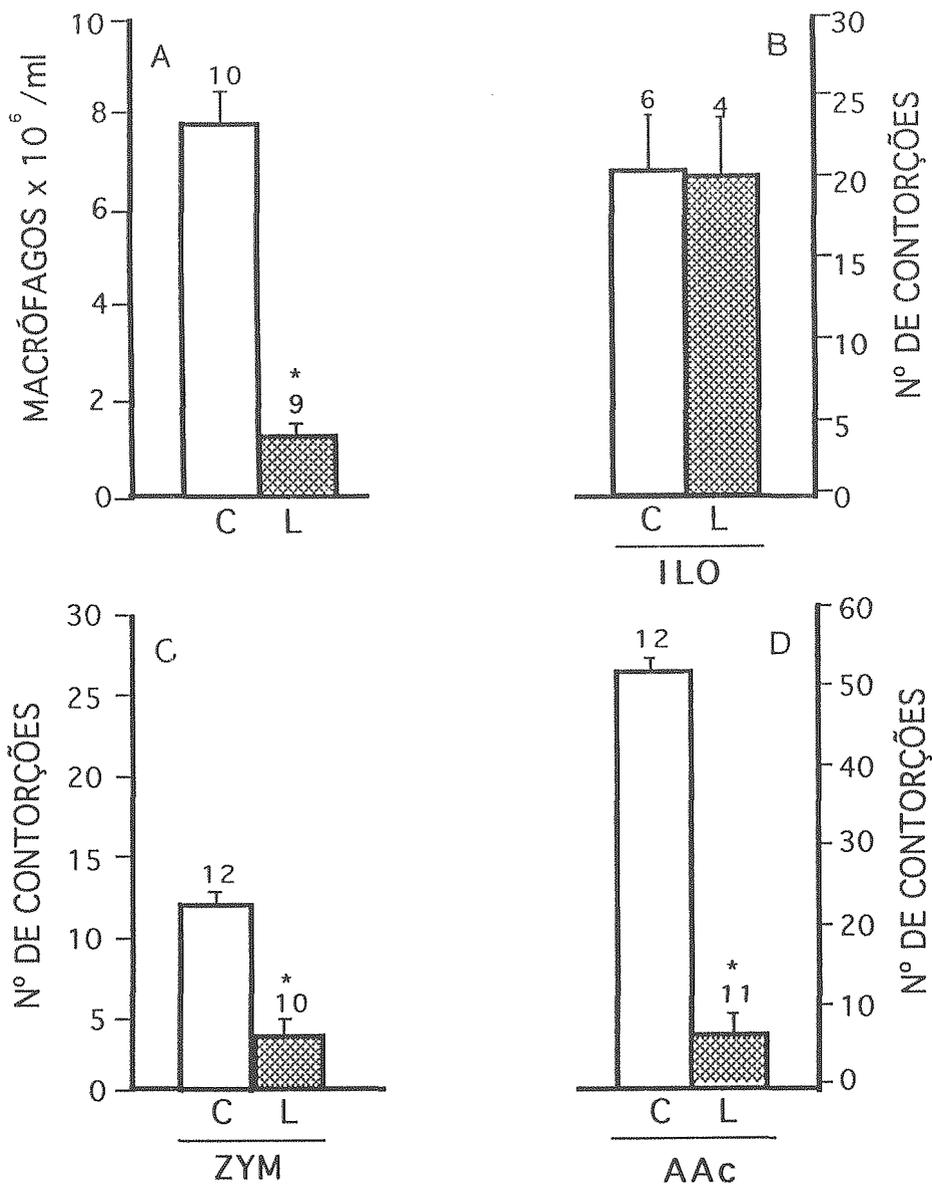


FIGURA 11. Efeito da depleção de células peritoneais residentes nas contorções abdominais induzidas pelo iloprost, zymosan e ácido acético. O painel A mostra o número de macrófagos x 10⁶/ml em cavidades normais de camundongos (controle, C) e naquelas lavadas (L) previamente (30 min antes). Os painéis B, C e D mostram, respectivamente, o efeito da injeção i.p. de iloprost (ILO-50µg/kg), zymosan (ZYM-1,0 mg/cavidade) e ácido acético (AAc-0,6%) na indução de contorções abdominais em animais normais (controle, C) e naqueles submetidos a lavagem peritoneal (L) prévia. As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o-min após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) p < 0,001 em relação aos respectivos grupos controle (C). Teste t de Student.

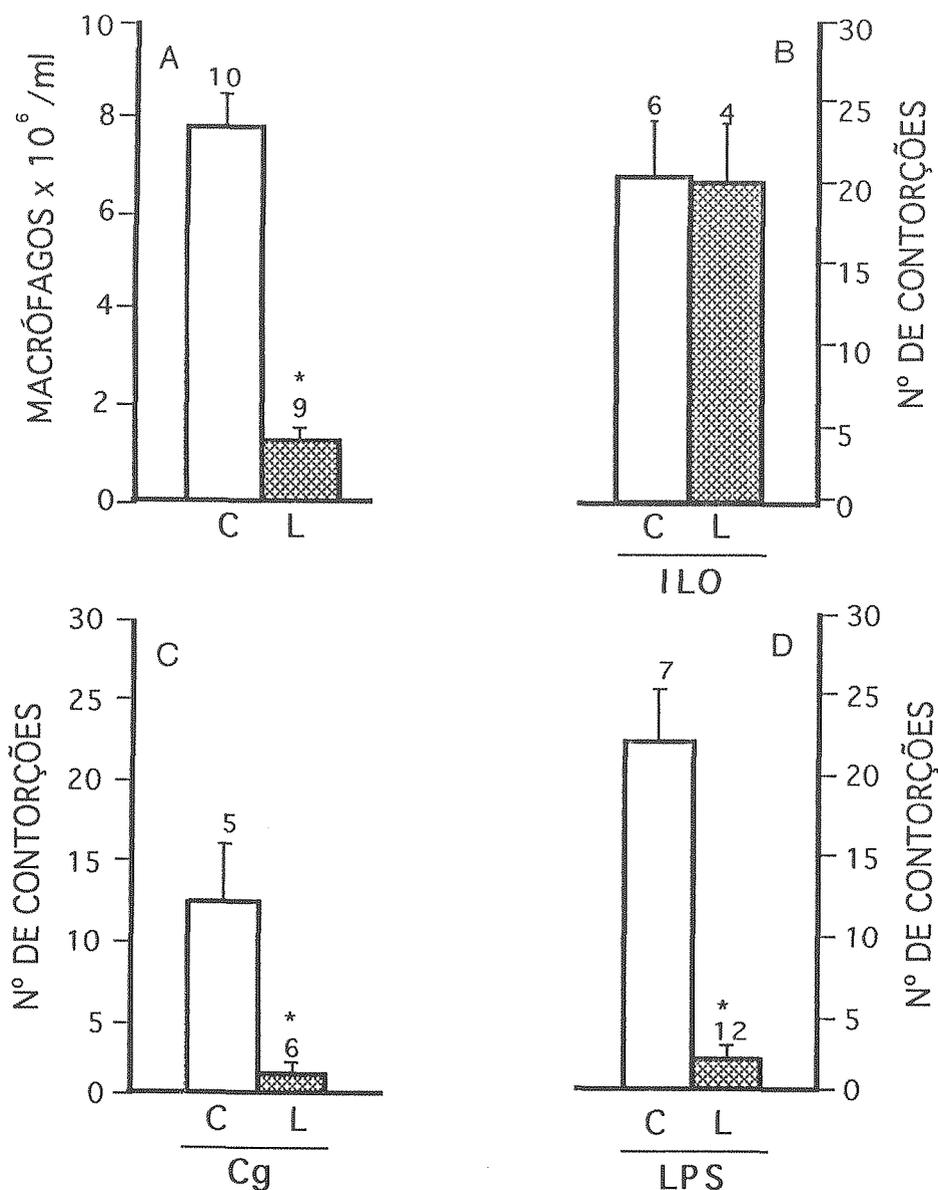


FIGURA 12. Efeito da depleção de células peritoneais residentes nas contorções abdominais induzidas pelo iloprost, carragenina e LPS. O painel A mostra o número de macrófagos x 10⁶/ml em cavidades normais de camundongos (controle, C) e naquelas lavadas (L) previamente (30 min antes). Os painéis B, C e D mostram, respectivamente, o efeito da injeção i.p. de iloprost (ILO-50µg/kg), carragenina (Cg-1,0 mg/cavidade) e LPS (LPS-0,25µg/ml - 0,01ml/g de peso) na indução de contorções abdominais em animais normais (controle, C) e naqueles submetidos a lavagem peritoneal (L) prévia. As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^omin após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) p < 0,02 em relação aos respectivos grupos controle (C). Teste *t* de Student.

8. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN E DO ÁCIDO ACÉTICO

O tratamento dos animais com tioglicolato (3%; 3ml; 4 dias antes) aumentou de forma bastante significativa (128,58%; $p < 0,001$) o número de macrófagos residentes nas cavidades peritoneais de camundongos (Figura 13A). Este tratamento prévio dos animais, amplificou a resposta nociceptiva observada após a injeção de zymosan (1 mg/animal; i.p.; 150,43% com $p < 0,01$) ou de ácido acético (0,3% e 0,6%; i.p.; 122,50% com $p < 0,05$ e 46,25% com $p < 0,01$, respectivamente) de forma também significativa (Figuras 13B, 13C e 13D, respectivamente).

9. EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ZYMOSAN, PELO ÁCIDO ACÉTICO E PELO LPS

Animais que receberam a injeção subcutânea (0,1 ml) de dexametasona (1 mg/kg, 30 minutos antes) e posteriormente a administração intraperitoneal (0,01 ml/g de peso) de zymosan (1 mg/animal), ácido acético (0,6%) ou LPS (0,25 μ g/ml) tiveram os efeitos nociceptivos provocados por zymosan (59,59%; $p < 0,01$), ácido acético (76,41%; $p < 0,001$) ou LPS (50,45%; $p < 0,05$) reduzidos de forma significativa (Figura 14).

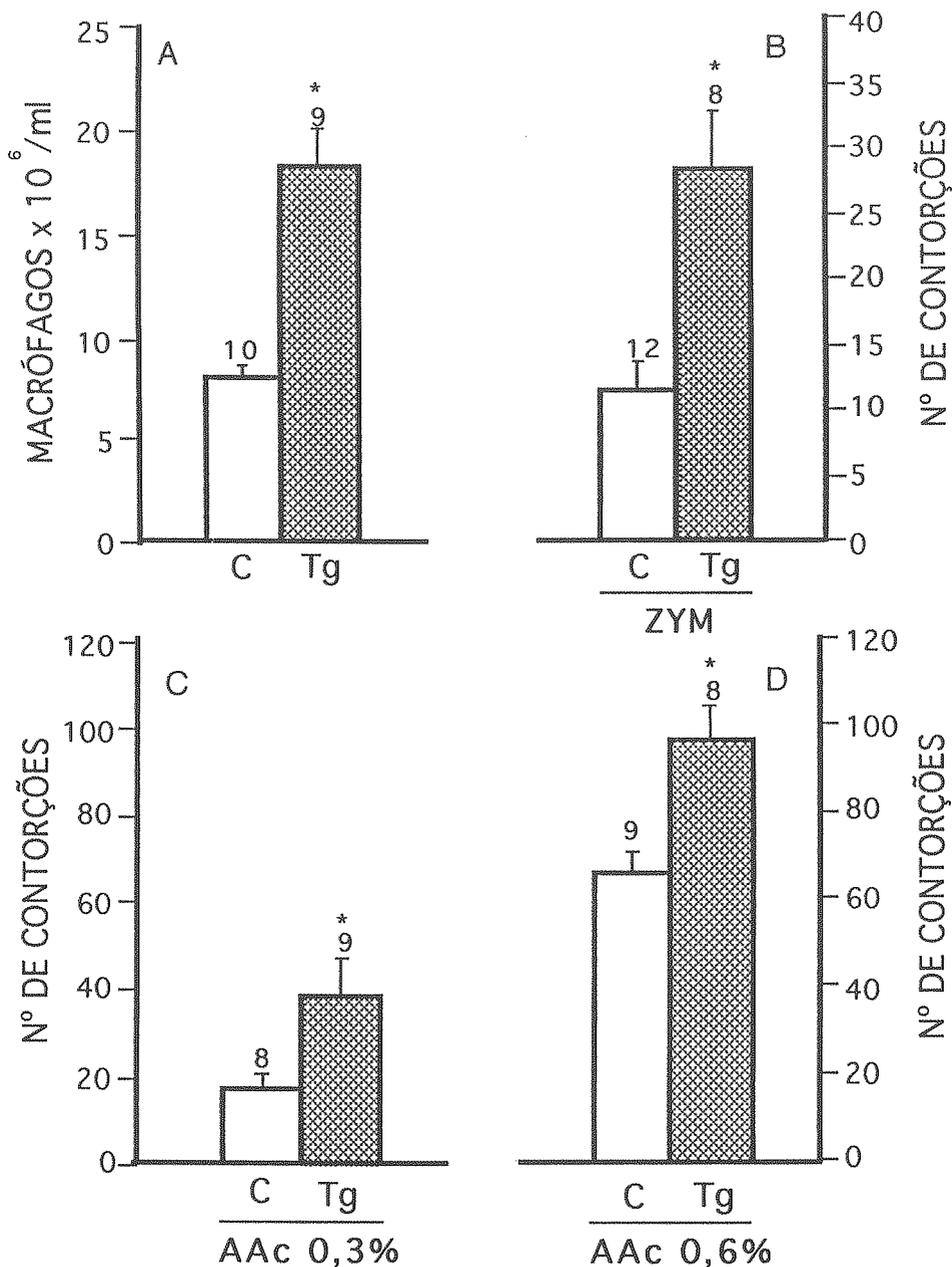


FIGURA 13. Efeito do aumento da população de macrófagos nas contorções abdominais induzidas pelo zymosan e pelo ácido acético. O painel A mostra o número de macrófagos x 10⁶/ml em cavidades normais de camundongos (controle, C) e naquelas pré-tratadas com tioglicolato (Tg; 3%; 3ml; 4 dias antes). Os painéis B, C e D mostram, respectivamente, o efeito da injeção i.p. de zymosan (ZYM - 1,0mg/cavidade), ácido acético (AAc - 0,3%) e ácido acético (AAc - 0,6%) na indução de contorções abdominais em animais normais (controle, C) e naqueles pré-tratados com tioglicolato (Tg; 3%; 3ml; 4 dias antes). As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^omin após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) p < 0,05 em relação aos respectivos grupos controle (C). Teste t de Student.

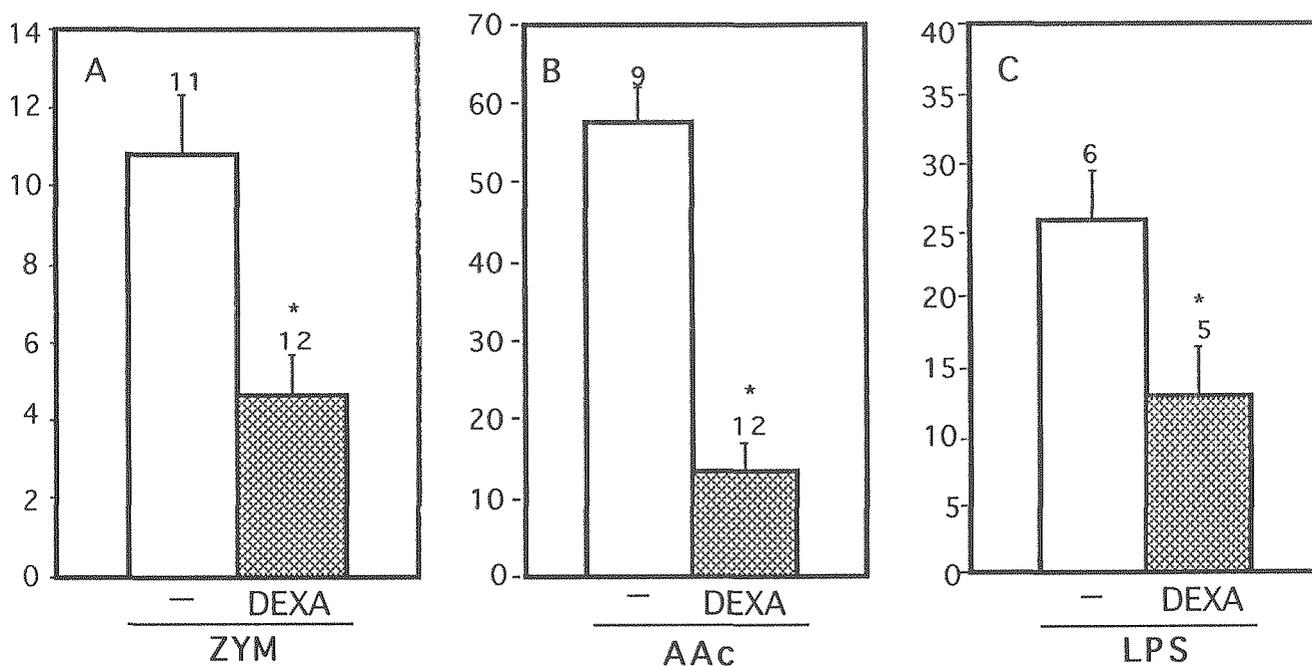


FIGURA 14. Efeito da dexametasona sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan, ácido acético ou LPS. Nos painéis A, B e C são mostrados os efeitos do tratamento com salina (-) ou com dexametasona (DEXA; 1 mg/kg; s.c.; 30 min antes) sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de zymosan (ZYM-1 mg/animal), ácido acético (AAc-0,6%; 0,1 ml/10g de peso) ou LPS (0,25 µg/ml; 0,1 ml/10g de peso), respectivamente. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40ºmin após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controles (-). Teste *t* de Student.

10. EFEITO DE BLOQUEADORES PROSTAGLANDÍNICO E SIMPÁTICO SOBRE AS ATIVIDADES NOCICEPTIVAS DO ZYMOZAN E DO ÁCIDO ACÉTICO

A administração subcutânea (0,1 ml) de indometacina (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes) bloqueou de forma significativa a atividade nociceptiva do zymosan (91,58% e 100%, respectivamente; $p < 0,001$) e do ácido acético (34,19% e 89,98%, respectivamente; $p < 0,001$) em ambas as doses. Entretanto, a administração s.c. de atenolol (0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes) e guanetidina (30 e 50 mg/kg; 3 dias consecutivos) bloqueou de forma significativa a nocicepção induzida pelo zymosan ou por ácido acético, apenas nas maiores doses para o zymosan (81,44% - Atn e 52,03% - Gua; $p < 0,001$) e em ambas as doses para o ácido acético (17,06% e 45,16% - Atn e 37,27% e 39,49% - Gua, respectivamente; $p < 0,01$). Quando associou-se a administração de indometacina (0,5 mg/kg) com atenolol (0,5 mg/kg) ou guanetidina (30 mg/kg), verificou-se o efeito amplificador da indometacina sobre o bloqueio evocado pelo atenolol (84,79% - ZYM e 37,82% - AAc; $p < 0,001$) e guanetidina (73,02% - ZYM e 52,72% - AAc; $p < 0,001$), tornando este efeito nestas doses também significativos para o zymosan (Figuras 15 e 16).

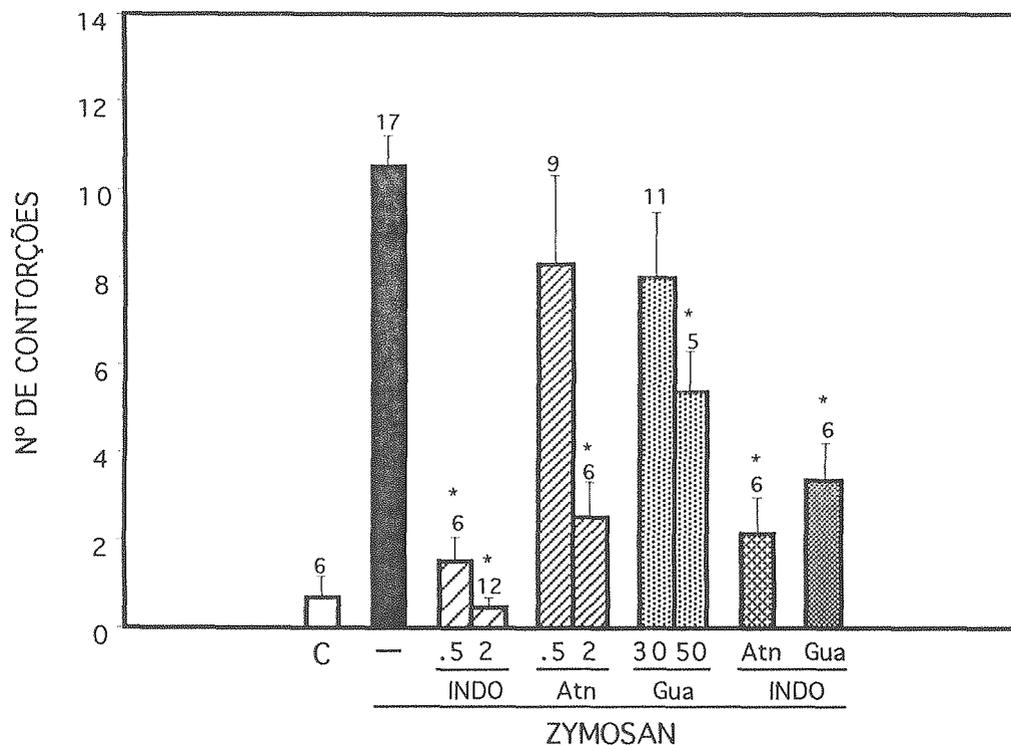


FIGURA 15. Efeito da indometacina, atenolol e guanetidina sobre as contorções abdominais induzidas pelo zymosan. Zymosan (1 mg/animal) foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso) em animais normais (-) e em animais previamente tratados por via s.c. com indometacina (INDO; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), atenolol (Atn; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), guanetidina (Gua; 30 e 50 mg/kg; 3 dias consecutivos), indometacina (0,5 mg/kg; 30 min antes) + atenolol (0,5 mg/kg; 30 min antes) e indometacina (0,5 mg/kg; 30 min antes) + guanetidina (30 mg/kg; 3 dias consecutivos); sendo o PBS, veículo de injeção, usado como controle (C). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção de zymosan em animais controles e pré-tratados. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student.

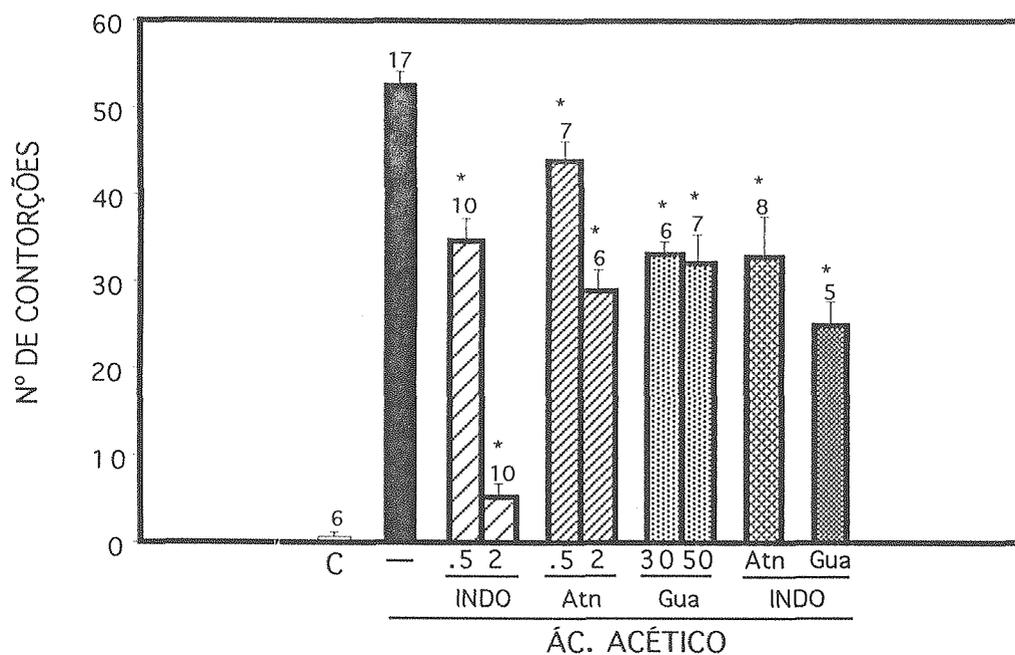


FIGURA 16. Efeito da indometacina, atenolol e guanetidina sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Ácido acético (0,6%) foi administrado i.p. (0,01 ml/g de peso) em animais normais (controle, C) e em animais previamente tratados por via s.c. com indometacina (INDO; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), atenolol (Atn; 0,5 e 2,0 mg/kg; 30 min antes), guanetidina (Gua; 30 e 50 mg/kg; 3 dias consecutivos), indometacina (0,5 mg/kg; 30 min antes) + atenolol (0,5 mg/kg) e indometacina (0,5mg/kg) + guanetidina (30 mg/kg; 3 dias consecutivos). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção do ácido acético em animais controles e pré-tratados. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student

11. EFEITO DOS SOROS ANTI-CITOCINAS SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS PROVOCADAS PELO ZYMOZAN, PELA CARRAGENINA E PELO ÁCIDO ACÉTICO

A pré-incubação do zymosan (1mg/animal), da carragenina (1mg/animal) ou do ácido acético (0,6%) com os anti-soros (50 µl) anti-TNF, anti-IL-1 e anti-IL-8, à temperatura ambiente por 10 minutos, foi capaz de inibir as contorções induzidas pelo zymosan (54,32%, $p < 0,001$ - TNF; 31,68%, $p < 0,01$ - IL-1; 27,81%, $p < 0,05$ - IL-8), pela carragenina (72,14%, $p < 0,001$ - TNF; 53,92%, $p < 0,01$ - IL-1; 38,92%, $p < 0,05$ - IL-8) e pelo ácido acético (68,23%, $p < 0,001$ - TNF; 53,63%, $p < 0,01$ - IL-1; 34,41%, $p < 0,05$ - IL-8) de forma significativa, sendo superior com o anti-TNF. (Figuras 17,18 e 19)

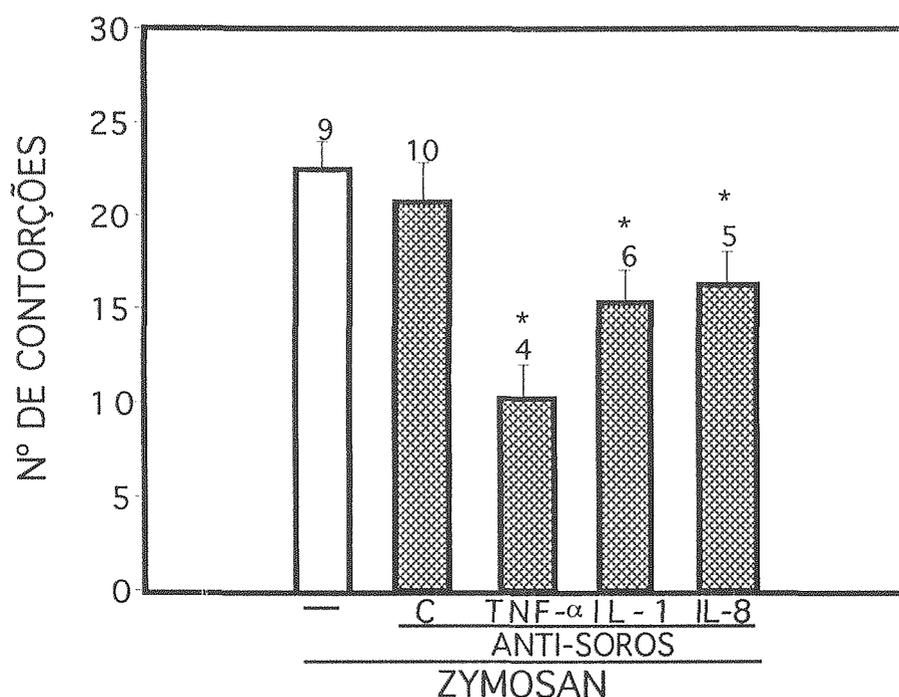


FIGURA 17. Efeito dos anti-soros anti-citocinas nas contorções abdominais induzidas pelo zymosan. Zymosan (1 mg/cavidade) isolado (controle; -) ou pré-incubado com os anti-soros (50 µl), anti-TNF-α, anti-IL-1 e anti-IL-8, além do soro controle (C), à temperatura ambiente por 10 minutos, foi injetado i.p. (0,01 ml/g de peso). As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student

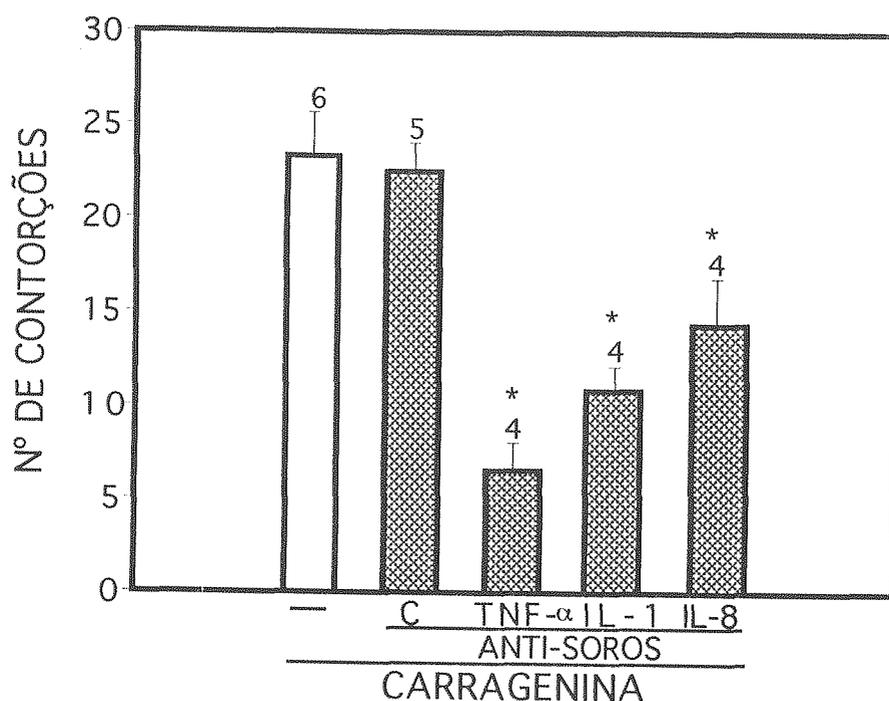


FIGURA 18. Efeito dos anti-soros anti-citocinas nas contorções abdominais induzidas pela carragenina. Os anti-soros (50 μ l) anti-TNF- α , anti-IL-1, anti-IL-8 e o soro controle (C), além do veículo de injeção, PBS (-), fora injetados i.p. e após 10 min os mesmos animais recebem uma solução de carragenina (1 mg/cavidade; i.p.; 0,01ml/g de peso). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após a injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C). Teste *t* de Student

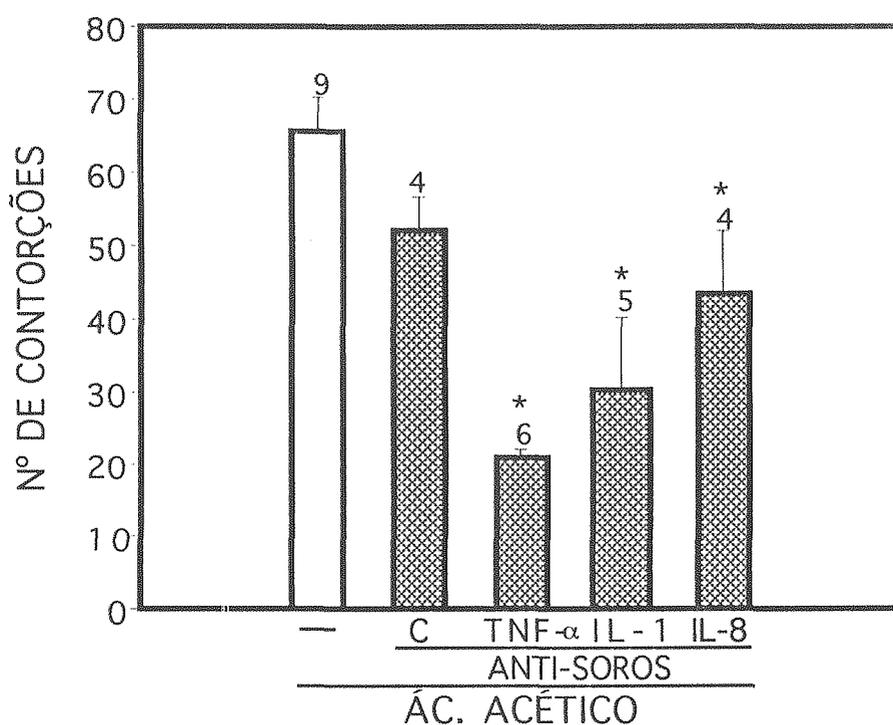


FIGURA 19. Efeito dos anti-soros anti-citocinas nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os antisoros (50 μ l), anti-TNF- α , anti-IL-1, anti-IL-8 e o soro controle (C), além do veículo de injeção, PBS (-), foram injetados i.p. e após 10 min os mesmos animais receberam uma solução de ácido acético (0,6 %; i.p.; 0,01ml/g de peso). As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas até o 40^o min após injeção dos estímulos. Os valores acima de cada barra representam o número de animais ensaiados em cada grupo. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C). Teste t de Student

IV. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que monocamadas de macrófagos estimuladas com LPS (5µg/ml) a 37°C, liberam no sobrenadante da cultura um fator nociceptivo capaz de induzir, de forma dose-dependente, atividade nociceptiva em camundongos, determinada pelo teste de contorções abdominais. Tal fator foi denominado neste trabalho de Fator Nociceptivo Secretado por Macrófagos (MNF). Este achado confirma dados anteriores obtidos no laboratório do Prof. Sérgio Ferreira do Departamento de Farmacologia da FMRP - USP (CAMPOS, CUNHA & FERREIRA, 1988).

A atividade nociceptiva deste fator atingiu um platô entre o 18º e 26º minuto após a sua injeção intraperitoneal. Dados bastante semelhantes foram encontrados por CAMPOS *et alii* (1988).

De posse desses achados procurou-se caracterizar farmacologicamente este fator nociceptivo secretado por macrófagos peritoneais. Dessa forma pode-se observar o que se segue nos parágrafos abaixo.

O MNF não é um produto da ciclooxigenase, tipo prostaglandina, prostaciclina ou tromboxano, dado que sua liberação por macrófagos, não foi bloqueada pela adição de inibidores da ciclooxigenase, indometacina ou paracetamol ao meio de cultura. A presença de metabólitos do ácido araquidônico na solução de MNF foi também descartada pelo procedimento de ultrafiltração usado na obtenção final do MNF concentrado, pois utilizou-se uma membrana Amicon que descarta moléculas com peso molecular abaixo de 10 Kda, o que é o caso de todos esses metabólitos do ácido araquidônico.

Adicionalmente foi também verificado que o MNF é um fator de natureza protéica. Tal conclusão baseia-se no fato de que ao adicionar-se ciclohexemida, um inibidor de síntese

protéica, às monocamadas de macrófagos, ter havido bloqueio na liberação do MNF. Um suporte indireto desta observação foi o fato da dexametasona também ter inibido a liberação do MNF. É bem conhecido que os glicocorticóides são inibidores clássicos da liberação de citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-8 (LEW, OPPENHEM & MATSUSHIMA, 1988; WAAGE & BAKKE, 1988; BARTON *et alii*, 1991; SEITZ *et alii*, 1991).

Ao longo de toda a introdução deste trabalho foi bem discutido que macrófagos são células hábeis em liberar diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-8 e TNF-alfa, as quais são potentes indutoras de hiperalgesia (CUNHA *et alii*, 1992). Nesse sentido, investigou-se no presente trabalho a possibilidade da atividade nociceptiva do MNF ser devida a presença de uma dessas citocinas nas amostras de MNF. Usando concentrações efetivas previamente determinadas (CUNHA *et alii*, 1992), de antisoros específicos anti-IL-1, anti-IL-8 ou anti-TNF-alfa, observou-se que todos os soros testados inibiram parcialmente, mas significativamente, a atividade nociceptiva do MNF. Tais resultados sugerem fortemente que a atividade do MNF pode ser devida a associação das atividades de IL-1 β , IL-8 e TNF-alfa presentes na amostra de MNF (sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS). A presença dessas citocinas neste sobrenadante foi recentemente descrita por RIBEIRO *et alii* (1993, 1995).

No intuito de confirmar que a atividade do MNF pudesse ocorrer por uma combinação dessas três citocinas, testou-se a atividade nociceptiva de IL-1, IL-8 e TNF- α em diferentes concentrações, isoladas ou em associação. Embora estas citocinas isoladamente, mesmo em altas doses, não foram capazes de promover significativa atividade nociceptiva no modelo de contorções em camundongos, quando IL-1, IL-8 e TNF- α foram injetadas em associação observou-se o surgimento de atividade nociceptiva, a qual em termos de intensidade e

curso temporal, muito se assemelhou àquela induzida pelo MNF. Tais dados, portanto, confirmam que a atividade nociceptiva do MNF deve-se a associação das atividades das 3 citocinas avaliadas (IL-1, IL-8 e TNF- α).

A nocicepção causada pelo MNF foi bloqueada de forma dose-dependente por inibidores da ciclooxigenase, indometacina e paracetamol, assim como por dexametasona. Os bloqueadores do sistema simpático, guanetidina e atenolol, também reduziram parcialmente o efeito do MNF. Entretanto a associação dos simpatolíticos com uma baixa dose de indometacina, que somente inibiu parcialmente o efeito do MNF, aboliu completamente a nocicepção induzida pelo MNF. Está bem estabelecido que a dor inflamatória resulta da sensibilização dos nociceptores provocada por 2 tipos distintos de mediadores liberados localmente: produtos da ciclooxigenase e simpatomiméticos (FERREIRA, LORENZETTI & CORREA, 1978; LEVINE *et alii*, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987; CUNHA *et alii*, 1991a e 1992). Os resultados aqui apresentados sugerem que, embora mediadores do sistema simpático estejam envolvidos neste processo, a presença de derivados da ciclooxigenase parece ser essencial para deflagrar a atividade do MNF, pois indometacina e paracetamol bloquearam completamente a nocicepção do MNF.

O efeito inibitório da dexametasona sobre a atividade do MNF pode ser explicado pela sua habilidade em bloquear a liberação de prostaglandinas via inibição da fosfolipase A₂, assim como inibição da expressão de ciclooxigenase 2 (BARNES & ADCOCK, 1993).

A participação da bradicinina no modelo de nocicepção aqui utilizado (contorções abdominais em camundongos), assim como em vários outros modelos de hiperalgesia inflamatória, tem sido descrita (STERANKA, MANNING & DEHASS, 1988; COSTELLO &

HARGREAVES, 1989; CHAU *et alii*, 1991). No presente estudo, demonstrou-se que HOE 140, um antagonista dos receptores BK₂ da bradicinina, inibiu parcialmente a nocicepção induzida pelo MNF, assim como aquela provocada pela administração da associação de citocinas (IL-1 β + IL-8 + TNF- α). Em adição, observou-se que, embora a bradicinina sozinha não tenha sido capaz de induzir nocicepção, mesmo em altas doses, ela potencializou a atividade nociceptiva de uma dose inefetiva da associação de citocinas (solução de IL-1 β + IL-8 + TNF- α diluída 3 vezes). Esses resultados sugerem que a associação de citocinas deve estar induzindo a produção local de bradicinina a qual, atuando em conjunto com outros mediadores liberados (prostaglandinas e/ou simpatomiméticos) participam da iniciação e manutenção do estado nociceptivo, pelo menos no modelo de contorções, aqui estudado. Diferente dos dados ora apresentados, tem sido descrito que, na hiperalgisia da pata de ratos provocada por carragenina e LPS, a liberação de bradicinina precede e induz a liberação de TNF- α , a primeira citocina da cascata de citocinas hiperalgésicas (CUNHA *et alii*, 1992). Além disso, bradicinina parece não estar envolvida no efeito hiperalgésico que se segue à injeção de TNF- α , IL-1 ou IL-8, já que seu antagonista BK₂, HOE 140, não altera tal resposta hiperalgésica (FERREIRA, LORENZETTI & POOLE, 1993). Uma possível explicação para essa aparente discrepância é que os modelos experimentais utilizados (Randall-Selitto x contorções) e as espécies de animais (ratos x camundongos) eram diferentes.

É importante ressaltar que, a semelhança do efeito inibitório do HOE 140 sobre as respostas nociceptivas induzidas pela associação de citocinas e pelo MNF é uma outra evidência de que o MNF parece ser de fato uma associação de IL-1 β , IL-8 e TNF- α .

Podemos, portanto, concluir nessa primeira etapa do trabalho, que a atividade nociceptiva do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS, aqui chamado MNF, ocorre devido a presença de IL-1, IL-8 e TNF- α . Estas citocinas induzem nocicepção principalmente via ativação do componente prostaglandínico da dor inflamatória, embora a ativação do componente simpático também esteja envolvido. Entretanto, elas induzem a liberação de bradicinina que participa no deflagrar da nocicepção.

Na segunda parte deste trabalho investigou-se a participação de macrófagos peritoneais e de produtos secretados pelos mesmos (ex. citocinas e prostaglandinas) na mediação da atividade nociceptiva de alguns estímulos inflamatórios clássicos tais como zymosan e ácido acético. O mesmo foi verificado também, embora parcialmente para carragenina e LPS.

Observou-se que todos os estímulos, zymosan, ácido acético, carragenina e LPS, foram capazes de induzir de forma dose-dependente, resposta nociceptiva quando injetados em cavidades peritoneais de camundongos, embora as respostas individuais tenham apresentado características peculiares a cada um desses estímulos. Nesse sentido torna-se importante ressaltar que as curvas dose-respostas do zymosan, carragenina e LPS apresentaram uma típica forma “em sino”, indicando que doses acima de um determinado valor, passam provavelmente a provocar respostas inibitórias. Este tipo de resposta tem sido mostrado na literatura para outros eventos inflamatórios como a migração de neutrófilos (CUNHA *et alii*, 1989). Retomaremos adiante, em um contexto mais abrangente, a discussão desse possível efeito inibitório observado no modelo utilizado neste trabalho.

No intuito de identificar *in vivo* a possível participação de macrófagos residentes na dor inflamatória, procurou-se demonstrar, através da manipulação da população destas células na

cavidade peritoneal, as alterações de intensidade ocorridas no número de contorções abdominais provocadas pela injeção de zymosan, ácido acético, carragenina e LPS. Dessa forma pode-se observar que:

(I) A depleção de células peritoneais residentes, principalmente macrófagos, pela lavagem prévia destas cavidades, bloqueou de forma bastante significativa, a atividade nociceptiva induzida por zymosan, ácido acético, carragenina ou LPS (70%, 87%, 90%, 91%, respectivamente);

(II) Tal procedimento entretanto, em nada alterou a atividade nociceptiva de um análogo estável de prostaciclina (PGI_2), que juntamente com prostaglandina E_2 , são considerados mediadores finais do fenômeno de dor inflamatória;

(III) Por outro lado, quando se aumentou a população de macrófagos residentes pelo tratamento prévio com tioglicolato, verificou-se uma amplificação das respostas nociceptivas induzidas pela injeção i.p. de zymosan e ácido acético (150%, 122%, respectivamente).

Os dados supramencionados sugerem fortemente que, pelo menos no modelo de contorções abdominais, o efeito nociceptivo de zymosan e ácido acético é, em grande parte, dependente da presença de células peritoneais residentes, e surge como consequência da ativação dessas células seguida da liberação de uma cascata de mediadores que seriam os indutores da resposta nociceptiva. Dado que macrófagos representam a grande maioria das células peritoneais residentes (cerca de 70 a 80%), e que o tratamento prévio com tioglicolato só amplifica em número a população destas células, assumiu-se no presente trabalho que devam ser os macrófagos as principais células-alvo envolvidas no efeito nociceptivo do zymosan e do ácido acético. Não se pode, entretanto, descartar a

possibilidade de outras células peritoneais residentes (ex. mastócitos e linfócitos) estarem também participando do processo. Ademais, esses dados são absolutamente coerentes com aqueles mostrados e discutidos na primeira parte do trabalho, onde verificou-se que macrófagos quando cultivados na presença de LPS são capazes de liberar um fator (MNF), o qual foi ativo em induzir nocicepção quando injetado em cavidades peritoneais de camundongos. Além disso, demonstrou-se que o MNF nada mais é do que uma associação de citocinas (IL-1, IL-8 e TNF- α).

Embora não se tenha demonstrado no trabalho que o aumento da população de macrófagos amplifica a resposta nociceptiva da carragenina e do LPS, o fato dessa resposta ter sido reduzida em cerca de 80% após a depleção prévia de células peritoneais residentes, pode sugerir que, a exemplo de zymosan e ácido acético, o efeito nociceptivo da carragenina e do LPS parece ser também dependente da presença dessas células.

O papel de macrófagos residentes como células iniciadoras da resposta inflamatória foi pioneiramente descrito por RUSSO em 1980 para outro evento como o recrutamento de neutrófilos da circulação para o foco inflamatório. FERREIRA neste mesmo ano, baseado nesses dados, e em outros de seu próprio laboratório, publica um editorial na revista *AGENTS AND ACTION* intitulado “São os macrófagos as células de alarme do organismo?” (FERREIRA, 1980).

Seguindo essa linha de raciocínio e utilizando-se da mesma metodologia do presente estudo, qual seja a manipulação para mais ou para menos da população de macrófagos peritoneais, já foi demonstrado que: (i) a redução do número de macrófagos residentes, por meio de lavagem da cavidade peritoneal, assim como o tratamento com soro

anti-macrófago, diminui significativamente a migração de neutrófilos em resposta à injeção de LPS, zymosan e carragenina (SOUZA & FERREIRA, 1985; SOUZA *et alli*, 1988); (ii) o aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal pela administração prévia de tioglicolato, aumenta a migração de neutrófilos para essa cavidade em resposta à injeção de LPS, carragenina, soro heterólogo e zymosan (SOUZA & FERREIRA, 1985; SOUZA *et alli*, 1988); (iii) macrófagos obtidos de cavidades peritoneais, quando estimulados *in vitro* com LPS, liberam, de forma dose-dependente, um fator quimiotático para PMN-neutrófilos ativo tanto *in vivo* como *in vitro* (CUNHA & FERREIRA, 1986; CUNHA, SOUZA & FERREIRA, 1986).

O mesmo grupo também demonstrou o papel de macrófagos peritoneais na migração de neutrófilos induzida por estímulos endógenos como IL-1- α , IL-1 β , TNF- α e TNF- β (FACCIOLI *et alii*, 1990), além de IFN- γ (RIBEIRO, CUNHA & FERREIRA, 1990).

O papel central de macrófagos residentes no acúmulo de neutrófilos induzido por LPS ou TNF- α também já foi descrito em outro modelo experimental, o da bolsa de ar subcutânea em camundongos (HARMSSEN & HAVELL, 1990).

TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 são exemplos típicos de citocinas multifuncionais envolvidas na resposta inflamatória, inclusive na dor, sendo as duas primeiras consideradas protótipos de citocinas pró-inflamatórias. A produção dessas citocinas não é constitutiva, mas induzida transitoriamente numa variedade de células e por estímulos diversos (DINARELLO, 1992). A constatação da existência de uma verdadeira rede de interações entre as citocinas, na qual umas influenciam a expressão ou inibição da expressão de outras,

é um aspecto importante neste campo (AKIRA *et alii*, 1990). Desse modo, já está demonstrado que TNF- α e IL-1 são potentes indutores da síntese de IL-8 e IL-6, sendo esta última reguladora da expressão de TNF- α e capaz de induzir a síntese de IL-1 (AKIRA *et alii*, 1990).

A confirmação de que macrófagos residentes estariam participando ativamente via liberação de citocinas na deflagração da resposta nociceptiva que se segue à injeção de zymosan, ácido acético ou carragenina foi obtida, no presente estudo, a partir da observação de que o pré-tratamento dos animais com soros específicos anti-citocinas (anti-IL-1, anti-TNF- α ou anti-IL-8) atenua significativamente a atividade nociceptiva de tais estímulos. Nesse contexto, torna-se importante ressaltar que a resposta inibitória foi superior quando se utilizou soro anti-TNF- α , o que pode sugerir um papel iniciador para essa citocina na cascata de mediadores envolvidos na resposta nociceptiva no modelo de contorções abdominais, à exemplo do que já fora demonstrado no modelo de hiperalgesia na pata de ratos (CUNHA *et alii*, 1992). Além disso, já está bem demonstrado para uma série de patologias que TNF- α constitui-se num mediador “pivô”, agindo *per se* ou através da indução de uma cascata de mediadores, inclusive citocinas (HINSHAW, OLSOM & KUO, 1989; FONG & LOWRY, 1990; DINARELLO, 1991).

Finalmente, foi ainda demonstrado na presente investigação que no modelo de contorções abdominais é também possível detectar-se os dois componentes da dor inflamatória, o componente eicosanóide e o simpático. Desse modo, mostrou-se que inibidores seletivos da ciclooxigenase (ex. indometacina) bloqueiam, quase que completamente, a atividade nociceptiva de zymosan e ácido acético, e agentes simpatolíticos

(ex. guanetidina e atenolol) a bloqueiam parcialmente, além de amplificarem o efeito atenuador de inibidores da ciclooxigenase; o que claramente comprova a ativação dos dois componentes a partir da injeção de estímulos nociceptivos.

De fato, DUARTE, NAKAMURA & FERREIRA já haviam descrito, em 1988, a participação do sistema simpático em adição à ativação do componente prostaglandínico no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Entretanto, esta é a primeira demonstração do envolvimento do sistema simpático associado ao componente eicosanóide nas contorções abdominais provocadas por injeção de zymosan. Além disso, essa também é a primeira demonstração da associação desses dois componentes com citocinas na avaliação da atividade nociceptiva no modelo de contorções abdominais.

Recentemente, foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de zymosan em camundongos induz uma típica resposta inflamatória aguda caracterizada por grande infiltração de neutrófilos e marcada biossíntese de metabólitos da lipo e ciclooxigenase (RAO *et alii*, 1994). Esses autores também demonstraram que animais geneticamente depletados de mastócitos (cepa WBB6F1-W/W) quando comparados com controles apropriados (cepa WBB6F1-+/+) apresentam uma diminuição significativa na infiltração de neutrófilos que se segue à injeção de zymosan, indicando que mastócitos peritoneais parecem exercer um efeito modulador endógeno neste evento inflamatório (RAO *et alii*, 1994).

É possível portanto que mastócitos peritoneais residentes participem também no deflagrar da resposta nociceptiva induzida, não só por zymosan, mas também por ácido acético ou carragenina no modelo de contorções abdominais. De fato, dados bem recentes

do nosso laboratório mostram que a depleção de mastócitos pelo tratamento crônico com Composto 48/80 (0,6 mg/12 em 12h/ 3 dias e 1,2 mg/12 em 12h no quarto dia) reduz em cerca de 50% o número de contorções abdominais observadas após injeção intraperitoneal de zymosan (1mg/animal) ou de ácido acético (0,6%) (VALE & RIBEIRO, 1996, dados não publicados).

Na figura 20, encontra-se uma esquematização da suposta cascata de mediadores liberados por células peritoneais residentes, particularmente macrófagos, responsáveis pela deflagração de nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais.

ESTÍMULOS
(ZYM, AAc, Cg, LPS)

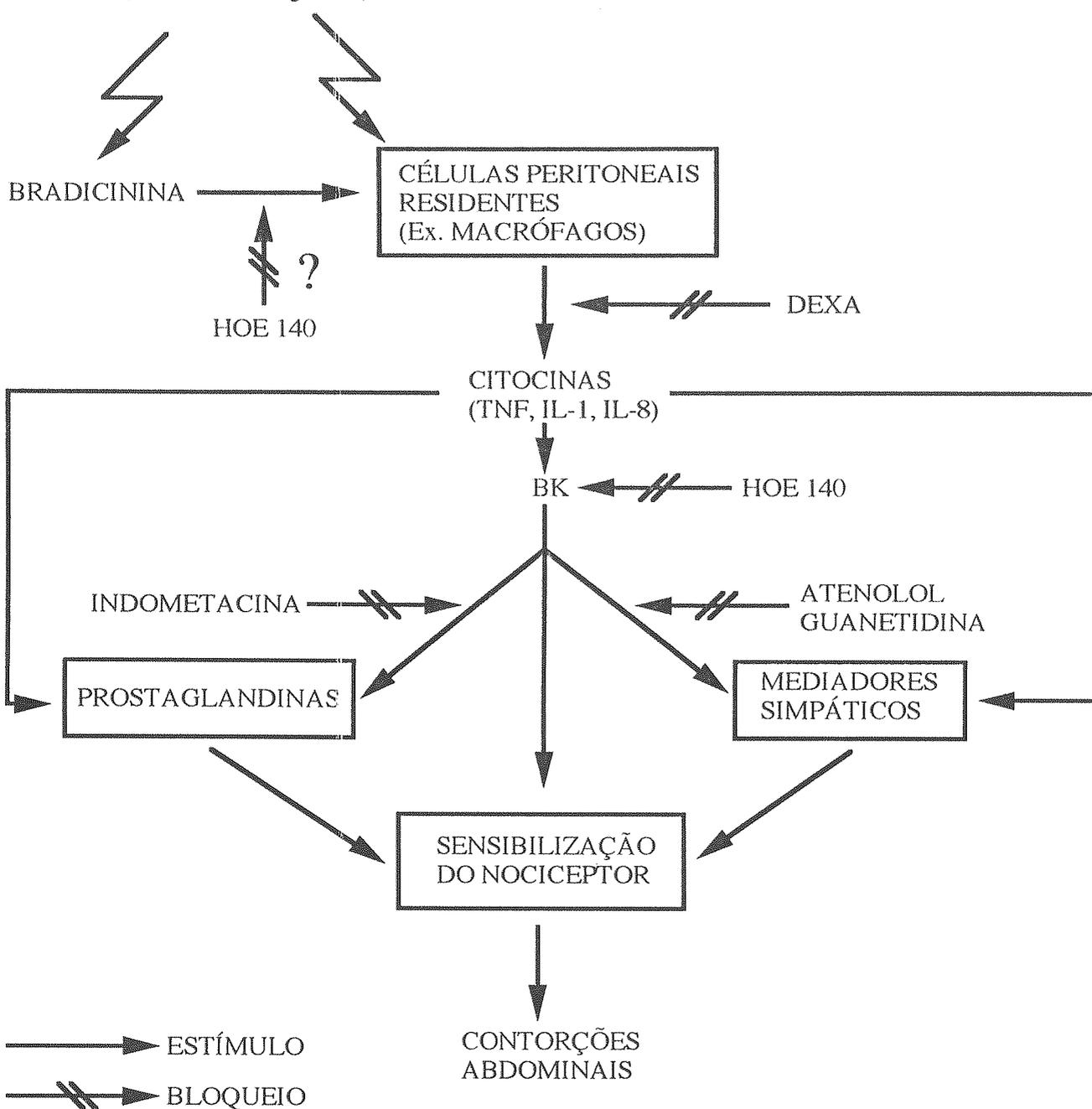


FIGURA 20. Esquema simplificado hipotético mostrando a participação de macrófagos na deflagração da cascata de mediadores, principalmente citocinas (IL-1, IL-8 e TNF- α) responsáveis pela nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais. AAc- ácido acético; ZYM- zymosan; Cg- carragenina; LPS- lipopolissacarídeo; DEXA- dexametasona.

V. CONCLUSÕES

1. Monocamadas de macrófagos estimuladas com LPS liberam no sobrenadante um fator capaz de induzir atividade nociceptiva (MNF) no modelo de contorções abdominais em camundongos, cuja liberação é bloqueada por inibidores de síntese protéica (ciclohexemida) ou de citocinas (dexametasona), mas não por inibidores de ciclooxigenase (indometacina ou paracetamol), indicando sua natureza protéica.

2. A atividade do MNF é sensível a antagonistas BK₂ de bradicinina (HOE 140), à indometacina, à dexametasona e à agentes simpatolíticos como guanetidina e atenolol, indicando que tal atividade deve-se à ativação dos componentes eicosanóide e simpático da dor .

3. O MNF trata-se de uma associação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8 e TNF- α), pois sua atividade é parcialmente neutralizada pela adição de anti-soros específicos, além do que a associação das mesmas induz atividade nociceptiva de comportamento semelhante à do MNF, fato este não observado quando tais citocinas são ensaiadas isoladamente.

4. Macrófagos parecem desempenhar um papel central na deflagração da nocicepção induzida por zymosan e ácido acético no modelo de contorções abdominais, provavelmente via liberação de mediadores tais como citocinas (IL-1, IL-8 e TNF- α), as quais ativariam os dois componentes da dor inflamatória, prostaglandínico e simpático.

***VI. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- AARDEN, L.A., BURNNER, T.K., CEROTTINI, J.C. *et alii*. Letter to the editor. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.*, **123**: 2928, 1979.
- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunology*, **2**: 282-289, 1984.
- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. Molecular transductional mechanisms by which IFN- γ and other signals regulate macrophage development. *Immunological Reviews*, **97**: 5-15, 1987.
- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. Phagocytic cells: cytotoxic activities of macrophages. Em: Gallin, J.I., Goldstein, I.M. & Snyderman, R. (editores). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press Ltd. New York, pp. 471-492, 1988.
- ADAMS, D.O. & KOERNER, T.J. Gene regulation in macrophage development and activation. *Year Immunology*, **4**: 159-181, 1988.
- AGGARWAL, B.B., MOFFAT, B. & HARKINS, R.N. Human lymphotoxin production by a lymphoblastoid cell line - purification and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**(4): 686-691, 1984.
- AGGARWAL, B.B., KOHR, W.J., HASS, P.E., MOFFAT, B., SPENCER, S.A. *et alii*. Human Tumor Necrosis factor, production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**(4): 2345-2354, 1985.
- AKIRA, S., HIRANO, T., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.*, **4**: 2860-2867, 1990.
- ALEXANDER, P. & EVANS, R. Endotoxin and double stranded RNA render macrophage cytotoxic. *Nature New Biol.*, **232**: 6, 1971.
- APTE, R.N., DURUM, S.K. & OPPENHEIM, J.J. Opioids modulate interleukin-1 production and secretion by bone-marrow macrophages. *Imm. Letters*, **24**: 141, 1990.
- ARAI, K., LEE, F., MIYAJIMA, A., MIYATAKE, S., ARAI, N. & YOKOTA, T. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.*, **59**: 783-836, 1990.
- ATKINS, E. Pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.*, **40**: 580, 1960.
- AURON, P.E., WEBB, A.C., ROSENWASSER, L.J., MUCCI, S.F., RICH, A. *et alii*. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 791, 1984.

- BAGLIONI, C., MCCANDLESS, S., TAVERNIER, J. & FIERS, W. Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on Hela and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. **J. Biol. Chem.**, **260**(25): 13395, 1985.
- BAIRD, L.G. & KAPLAN, A.M. Immunoadjuvant activity of pyran copolymer. I-Evidence for direct stimulation of T-lymphocytes and macrophages. **Cell. Immunol.**, **20**: 167, 1975.
- BARNES, P.J. & ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **TIPS Reviews**, **14**: 436, 1993.
- BARTON, B.E., JAKWAY, J.P., SMITH, S.R. & SIEGAL, M.I. Cytokine inhibition by a novel steroid, mometasone furoate. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, **13**: 251-261, 1991.
- BECTON, D.L., ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. Characterization of protein kinase C activity in interferon gamma treated murine peritoneal macrophages. **J. Cell. Physiol.**, **125**: 485, 1985.
- BELLER, D.I., KIELY, J.E. & UNANUE, E.R. Regulation of macrophage population - Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunological stimuli. **J. Immunol.**, **124**: 1426, 1980.
- BELOSEVIC, M., FINBLOOM, D.S., MELTZER, M.S. & NANCY, C. IL-2 a cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. **J. of Immunology**, **145**: 831, 1990.
- BENBEHANI, K., BELLER, D.I. & UNANUE, E.I. The effects of beryllium and other adjuvants on Ia expression by macrophage. **J. Immunol.**, **134**: 2047, 1985.
- BERESFORD, I.J.M. & BIRCH, P.J. Antinociceptive activity of the bradykinin antagonist HOE 140 in rat and mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **105**: 1-314P, 1992.
- BERNTON, E., BEACH, J.E., HOLADAY, J.W. *et alii*. Release of multiple hormone by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. **Science**, **238**: 519, 1987.
- BERTOLINI, M.C. & DE LUCCA, F.L. Poly (A)-containing RNA from the spleens of mice with Chagas' disease triggers *in vitro* macrophage resistance to *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, **33**(1): 81, 1986.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, **320**: 584, 1986.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. **N. Engl. J. Med.**, **316**(7): 379, 1987.

- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**: 505, 1988.
- CAMPOS, D.I., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. A new mechanism of action of Dipyrone: Blockage of the release of nociceptive factor from macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **21**: 565-568, 1988.
- CAMPOS, D.I. Fator algogênico de macrófago: Estudo de drogas analgésicas e antiinflamatórias. Dissertação de Mestrado, FMRP-USP, Ribeirão Preto, 1990.
- CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R., eds. *Textbook of pain*. 2. ed. Oxford, Churchill Livingstone, 1989, pp. 22-45.
- CARSWELL, E.A., OLD, L.J., KASSEL, R.L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**(9): 3666, 1975.
- CHAU, T.T., LEWIN, A.C., WALTER, T.L., CARLSON, R.P. & WEICHMAN, B.M. Evidence for a role of bradykinin in experimental pain models. *Agents Actions*, **34**: 235-238, 1991.
- COHEN, S., PICK, E. & OPPENHEIM, J.J., Eds. *Biology of the lymphokines*. Academic Press, New York, 1979.
- COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy and future. *J. Immunol.*, **121**(3): 813-816, 1978.
- COLDITZ, I., ZWAHLEN, R., DEWALD, B. & BAGGLIOLINI, M. In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am. J. Pathol.*, **134**: 755, 1989.
- COLEY, W.B. The treatment of malignant Tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.*, **105**: 487, 1983.
- COLLIER, H.O.J., DINNEEN, L.C., JOHNSON, C.A. & SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, **32**: 295-310, 1968.
- COSTELLO, A.H. & HARGREAVES, K.M. Suppression of carrageenan hyperalgesia, hyperthermia and edema by a bradykinin antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **171**: 259-263, 1989.

- CRAWFORD, R.M., FINBLOOM, D.S., OHARA, J., PAUL, W.E. & MELTZER, M.S. B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. **J. of Immunology**, **139**: 135, 1987.
- CREASEY, A.A., YAMAMOTO, R. & VITT, C.R. A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 3293, 1987.
- CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, **129**: 65-76, 1986.
- CUNHA, F.Q., SOUZA, G.E.P. & FERREIRA, S.H. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an "vivo" demonstration. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19**: 775, 1986.
- CUNHA, F.Q., SOUZA, G.E.P., SOUZA, C.A.M., CERQUEIRA, B.C.S. & FERREIRA, S.H. *In vivo* blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **Br. J. Exp. Pathol.**, **70**: 1-8, 1989.
- CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S. & FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, **104**: 765-767, 1991a .
- CUNHA, F.Q., TAMASHIRO, W.M.S.C., FIGARI, I. & PALLADINO JR, M. Efeito da interleucina 8 e do fator de necrose tumoral sobre a liberação de neutrófilos. Em: VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos. Legis Summa. Ribeirão Preto, 1991b, pp. 339.
- CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 660-664, 1992.
- DAVIES, A. & PERKINS, M.N. Interleukin-1 β , but not tumour necrosis factor- α , can induce desArg⁹bradykinin-mediated mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, Proceedings, Jan 1993, C19.
- DINARELLO, C.A. The proinflammatory cytokines Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, **163**: 1177-1184, 1991.
- DINARELLO, C.A. Biology of interleukin-1. **FASEB J.**, **2**: 108, 1988.
- DINARELLO, C.A. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. Em: **Basis Principles and Clinical Correlates**, 2nd. Edition (J.I. Gallin, I.M. Goldstein & R. Snyderman. Eds.), cap.12, pp. 211-232, Raven Press, New York, 1992.

- DRAY, A. & PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci*, **16**: 99-104, 1993.
- DUARTE, I.D.G., NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **21**: 341-343, 1988.
- DURUM, S.K. & OPPENHEIM, J.J. Macrophage-derived mediators: IL1, TNF, IL6, IFN and related cytokines. Em: Paul, W.E. (editor). *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, cap. 22, pp. 639, 1989.
- DUARTE, I.D.G., SANTOS, I.R., LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Europ. J. Pharmacol.*, **217**: 225-227, 1992.
- ECONOMOU, J.S., McBRIDE, W.H., ESSNER, R. *et alii*. Tumor necrosis factor production by IL-2 activated macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*, **67**: 514, 1989.
- EVANS, R. & ALEXANDER, P. Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. Em: Nelson, D.S. (editor). *Immunobiology of the Macrophage*. Academic Press, New York, pp. 535, 1976.
- FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., 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*, **30**: 344, 1990.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B. & CORREA, F.M.A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, **53**: 39-48, 1978.
- FERREIRA, S.H. & NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia: a cAMP/Ca⁺⁺ dependent process. *Prostaglandins*, **18**: 179-190, 1979.
- FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells. *Agents and Actions*, **10**: 229, 1980.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., BRISTOW, A.F. & POOLE, S. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, **334**(6184): 698, 1988.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B. & POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, **110**: 1227-1231, 1993.
- FINCHAM, N.J., CAMP, R.D.R., GEARING, A.J.H., BIRD, C.R. & CUNNINGHAM, F.M. Neutrophil chemoattractant and IL-1 like activity in samples from psoriatic skin lesions. *J. Immunol.*, **140**: 4294, 1988.

- FOLLENFANT, R.L., NAKAMURA, M. & GARLAND, L.G. Sustained hyperalgesia in rats evoked by the protein kinase inhibitor H-7. *Br. J. Pharmacology*, **99**: 289P, 1990.
- FONG, Y & LOWRY, S.F. Tumor Necrosis Factor in pathophysiology of infection and sepsis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **55**: 157-161, 1990.
- FRENDL, G., FENTON, M.J. & BELLER, D.I. Regulation of macrophage activation by IL-3. II - IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. *J. Immunol.*, **144**: 3400, 1990.
- FUHLBRIGGE, R.C., CHAPLIN, D.D., KIELY, J.M. & UNANUE, E.R. Regulation of interleukin-1 gene expression by adherence and lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, **138**: 3799, 1987.
- GERY, I., GERSHON, R.K. & WAKSMAN, B.H. Potentiating of the T-lymphocyte response to antigens 1: the responding cell. *J. Exp. Med.*, **136**: 128-142, 1972.
- GERY, I. & HANDSCHUMACHER, R.E. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. III - Properties of the mediators from adherent cells. *Cell. Immunol.*, **11**: 162, 1974.
- GHIARA, P., BORASCHI, D., NENCIONI, L. *et alii*. Enhancement of *in vivo* Immune response by tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **139**: 3678, 1987.
- GIMBRONE, M.A., OSBIN, M.S., BROCK, A.F., LUIS, E.A., HASS, P.E., HERBERT, C.A. *et alii*. Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, **246**: 1601, 1989.
- GORDON, S. Biology of macrophage. *J. Cell. Sci., Suppl.*, **4**: 267, 1986.
- GORDON, J.R., BURD, P.R. & GALLI, S.J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today*, **11**(12): 458, 1990.
- GRANGER, G.A. & WILLIAMS, T.W. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor. *Nature*, **218**: 1253, 1968.
- GREEN, S., DOBRJANSKY, A. & CHIASSON, M.A. Murine tumor necrosis inducing factor: purification and effects on myelomonocytic leukemia cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**: 997, 1982.
- GREGORY, H., JOUNG, J., SCHRODER, J.M., MROWIETZ, U. & CHRISTOPHERS, E. Structure determination of a human lymphocyte derived neutrophil activating peptide (LYNAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**: 883, 1988.

- GUBLER, U., CHUA, A.O., STERN, A.S. *et alii*. Recombinant human interleukin 1 alpha: purification and biological characterization. **J. Immunol.**, **136**: 2492, 1986.
- HAMILTON, T.A., JANSEN, M.M., SOMERS, S.D. & ADAMS, D.O. Effects of bacterial lipopolysaccharide on protein synthesis in murine peritoneal macrophages: Relationship to activation for macrophage tumoricidal function. **J. Cell. Physiol.**, **128**: 9, 1986.
- HAMILTON, T.A. & ADAMS, D.O. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. **Immunol. Today**, **8**: 151, 1987.
- HARMSSEN, A.G. & HAVELL, E.A. Roles of Tumor Necrosis Factor and macrophages in lipopolysaccharide-induced accumulation of neutrophils in cutaneous air pouches. **Infect. Immun.**, **58(2)**: 297-302, 1990.
- HECHTMAN, D.H., CYBULSKY, M.I., FUCHS, H.J. *et alii*. Intravascular IL-8: Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. **J. Immunol.**, **147(3)**: 883, 1991.
- HENDERSON, B. & POOLE, S. Modulation of cytokine function: Therapeutic applications. **Advances in Pharmacology**, **25**: 53-115, 1994.
- HINSHAW, L., OLSOM, P. & KUO, G. Efficacy of pos-treatment with anti-TNF monoclonal antibody in preventing the pathophysiology and lethality of sepsis in the baboon. **Circulatory Shock**, **27**: 362-369, 1989.
- JOHNSTON JR, R.B. Monocytes and macrophages. **New Eng. J. Med.**, **138**: 747, 1988.
- KEHRL, J.H., MILLER, A. & FAUCI, A.S. Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen - Activated human B cells. **J. Exp. Medicine**, **166**: 781, 1987.
- KETTELHUT, I.C., FIERG, W. & GOLDBERG, A.L. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by ciclo-oxygenase inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 4273, 1987.
- KLEBANOFF, S.J., VADAS, M.R., HARLAN, J.M. *et alii*. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, **136**: 4220, 1986.
- KOERNER, T.J., HAMILTON, T.A. & ADAMS, D.O. Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lypopolysaccharide Evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. **J. Immunol.**, **139**: 239, 1987.
- KULL, F. & CUATRECASAS, P. Necrosin: purification and properties of a cytotoxin derived from a murine macrophage-like cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**: 7932, 1984.

- KURT-JONES, E.A., BELLER, D.I., MIZEL, S.B. & UNANUE, E.R. Identification of a membrane - Associated interleukin 1 in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 1204, 1986.
- LARRICK, J.W. & KUNKEL, S.L. The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. **Pharmaceut. Res.**, **5**(3): 129, 1988.
- LARSEN, C.G., ANDERSON, A.O., APPELLA, E. *et alii*. Neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. **Science**, **243**: 1464, 1989.
- LE, J. & VILCEK, J. Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Lab. Invest.**, **56**(3): 234, 1987.
- LEVINE, J.D. *et alii*. Hiperalgesic properties of 15-Lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 5331-34, 1986.
- LEW, W., OPPENHEIM, J.J. & MATSUSHIMA, K. Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **J. Immunol.**, **140**: 1895-1902, 1988.
- LIBBY, P., ORDOVAS, J.M., AUGER, K.R. *et alii*. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cell. **Am. J. Pathol.**, **124**: 179, 1986.
- LINDBLOM, U. *et alii*. Pain terms. A current list with definitions and notes on usage. Apud MERSKEY, H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain, Supplement**, **3**: S215-21, 1986.
- LINDLEY, I., ASCHAUER, H., SEIFERT, J.M., LAM, C., BRUNOWSKI, W., KOWNTAZKIE *et alii*. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil activating factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**: 9199, 1988.
- MACKANESS, G.B. The monocyte in cellular immunity. **Semin. Hemotol.**, **7**: 172, 1970.
- MACLEOD, R. & REMINGTON, J.S. Studies on the specificity of killing of intracellular pathogens by macrophages. **Cell. Immunol.**, **34**: 156, 1977.
- MALKOVSKY, M., LOVELAND, B., NORTH, M. *et alii*. Recombinant interleukin 2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. **Nature**, **325**: 262, 1987.

- MATSUSHIMA, K., TAGUCHI, M., KOVACS, E.J., YOUNG, H.A. & OPPENHEIM, J.J. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin-1 activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. **J. Immunol.**, **136**: 2883, 1987.
- MATSUSHIMA, K., MORISHITA, K., YOSHIMURA, T., LAVU, S., KOBAYASHI, Y., LEW, W., APPELLA, E., KUNG, H.F., LEONARD, E.J. & OPPENHEIM, J.J. Molecular cloning of human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MNDCF) and the induction of MNDCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.**, **167**: 1883, 1988.
- METCHNIKOFF, E. Immunity to infective diseases. London: Cambridge University Press, 1905.
- MCKAY, R.J. & RUSSEL, S.W. Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing. **J. Immunol.**, **137**: 1392, 1986.
- MERRIMAN, C.R., PULLIAM, L.A. & KAMPSCHMIDT, R.F. Comparison of leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator. **Proc. Natl. Soc. Exp. Biol. Med.**, **154**: 224, 1977.
- MILLON, G., LEBASTARD, M. & MARCHAL, G. Role of T lymphocytes in macrophage populations. **Mol. Biol. Infec. Dis.**, **59**: 291, 1988.
- MIZEL, S.B. The interleukins. **FASEB J.**, **3**: 2379, 1989.
- MONCADA, S., FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. Pain and inflammatory mediators. In: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. Inflammation. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, v.50/I, pp. 588-616, 1978.
- MORRISEY, P.J., BRESSLER, L., CHARRIER, K. & ALFERT, A. Response of resident murine peritoneal macrophages to *in vivo* administration of granulocyte - macrophage colony - stimulating factor. **J. Immunol.**, **140**: 1910, 1988.
- NAGAOKA, I., KANEKO, H. & YAMASHITA, T. Inhibition of the accumulation of macrophages and the generation of macrophage chemotactic activity by dexamethasone in concanavalin-A induced peritonitis in mice. **Agents and Actions**, **25**: 156, 1988.
- NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, **135**: 145-153, 1987.
- NATHAN, C.F. & ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: Dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.**, **146**: 1648, 1977.

- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, **79**: 319, 1987.
- NAWROTH, P.P., BANK, I., HANDLEY, D. *et alii*. Tumor necrosis factor-cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1. *J. Exp. Med.*, **163**: 1363, 1986.
- NORTH, R.J. Cellular kinetics associated with the development of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.*, **130**: 299, 1969.
- NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.*, **121**(3): 806, 1978.
- OGMUNDSDOTTIR, H.M. & WEIR, D.M. Mechanisms of macrophage activation. *Clin. Exp. Immunol.*, **40**: 233, 1980.
- OLD, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, **30**: 630, 1985.
- O'MALLEY, W.E., ACHINSTEIN, B. & SHEAR, M.J. Action of bacterial polysaccharide on tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **29**: 1169, 1962.
- OPPENHEIM, J.J., MATSUSHIMA, K., YOSHIMURA, T. *et alii*. Relationship between interleukin 1 (IL1), tumor necrosis factor (TNF) and a neutrophil attracting peptide (NAP-1). *Agents and Actions*, **26**(1/2): 134, 1989.
- PERKINS, M.N. & KELLY, D. Interleukin-1 β (IL-1 β), but not tumour necrosis factor- α (TNF- α), can induce bradykinin. B₁ receptor-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, Proceedings, Jan 1993, C18.
- PEVERI, P., WALZ, A., DEWALD, B. & BAGGIOLINI, M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **167**: 1547, 1988.
- PHILLIP, R. & EPSTEIN, L.B. Tumor necrosis factor as immunomodulation and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma - interferon and interleukin 1. *Nature*, **323**: 86, 1986.
- PORTENOY, R.K. Mechanisms of clinical pain. Observations and speculations. In: - Pain: Mechanisms and Syndrome. *Neurologic Clinics*, **7**(2): 205-30, 1989.
- RAMPART, M., VAN DAMME, J., ZONNEKEYN, L. & HERMAN, A.G. Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am. J. Pathol.*, **135**: 21, 1989.
- RAO, T.S., CURRIE, J.L., SHAFFER, A.F. & ISAKSON, P.C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **269**(3): 917-925, 1994.

- RAZ, A., SHAHAR, A. & GOLDMAN, R. Characterization of an *in vivo* induced peritoneal macrophages population following intraperitoneal injection of concanavalin A. **J. Reticulo Endot. Soc.**, **22**: 445, 1977.
- REMINGTON, J.S., KRAHENBUHL, J.C. & MENDENHALL, J.W. A role for activated macrophages in resistance to infection with toxoplasma. **Infect. Immunol.**, **6**: 829, 1972.
- REVEL, M. & CHEBOTH, J. Interferon activated genes. **Trends Biochem. Sci.**, **11**: 166, 1986.
- RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by release of macrophages neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Path.**, **71**: 717, 1990.
- 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**, **73**: 472, 1991.
- RIBEIRO, R.A., DE LUCCA, F.L., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. RNA from LPS-stimulated macrophages induces the release of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 by resident macrophages. **Mediators of Inflammation**, **2**: 435-442, 1993.
- 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.**, **148**: 105-113, 1995.
- RUBIN, B.Y., ANDERSON, S.L., SULLIVAN, S.A. *et alii*. High affinity binding labeled human tumor necrosis factor (Lukii) to specific cell surface receptors. **J. Exp. Med.**, **162**: 1099, 1985.
- RUDDLE, N.H. & WAKSMAN, B.H. Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity. **Science**, **157**: 1060, 1967.
- RUSKIN, J., McINTOSH, J. & REMINGTON, J.S. Studies on the mechanisms of resistance to phylogenetically diverse intracellular organisms. **J. Immunol.**, **103**: 252, 1969.
- RUSSO, M. The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacterial lipopolysaccharides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **164**: 326, 1980.
- SAPOLSKI, R., RIVIER, C., YAMAMOTO, G. *et alii*. Interleukin 1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, **238**: 521, 1987.

- SCHEURICH, P., THOMA, B., UCER, U. & PFIZENMAIER, K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF- α): induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α mediated enhancement of T cell responses. *J. Immunol.*, **138**: 1786, 1987.
- SCHRODER, J.M., MROWIETZ, U., MORITA, E. & CHRISTOPHERS, E. Purification and partial biochemical characterisation of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-1 activity. *J. Immunol.*, **139**: 3474, 1987.
- SCHULTZ, R.M., PAPAMATHEAKIS, J.D., & CHIRIGOS, M.A. Direct activation *in vitro* of mouse peritoneal macrophages by pyran copolymer (NSC 46015). *Cell. Immunol.*, **29**: 403, 1977.
- SEITZ, M., DEWALD, B., GERBER, N. & BAGGIOLINI, M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, **87**: 463-469, 1991.
- SHEAR, M.J., TURNER, F.C., PERRAULT, A. & SHOVELTON, T. Chemical treatment of tumors.V. Isolation of the hemorrhage - production fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**: 81-97, 1943, *Appud*, CARSWELL *et alii*, 1975.
- SHIRAKAWA, F., TANAKAY, Y., ETO, S. *et alii*. Effect of IL-1 on the expression of IL-2 receptor (the antigen) on human natural killer cell and natural killer-like cell line (YT) cells. *J. Immunol.*, **137**: 551, 1986.
- SIMS, J.E. & DOWER, S.K. Interleukin-1 receptors. *Eur. Cytokine Netw.*, **5(6)**: 539-546, 1994.
- SNEDECOR, G.W. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa University Press, Iowa, 1963.
- SOLBACH, W., MOLL, H. & ROLLINGHOFF, M. Lymphocytes play the music but the macrophages cells the tune. *Immunol. Today*, **12**: 4, 1991.
- SOUZA, G.E.P. & FERREIRA, S.H. Blockage by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Actions*, **17**: 97-103, 1985.
- STEEG, P.S., MOORE, R.N. & OPPENHEIM, J.J. Regulations of murine macrophage Ia - antigen expression by products of activated spleen cells. *J. Exp. Medicine*, **152**: 1734, 1980.

- STEEG, P.S., JOHNSON, H.M. & OPPENHEIM, D.O. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine inhibitory effect of endotoxin. *J. Immunol.*, **129**: 2402, 1982.
- STEINMAN, R.M., NOGUEIRA, N., WITNER, M.D. *et alii*. Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia - antigens on cultured mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Medicine*, **152**: 1248, 1980.
- STERANKA, L.R., MANNING, D.C. & DEHASS, C.J. Bradykinin as pain mediator: receptors are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3245-3249, 1988.
- TAIWO, Y.O., BJERKNES, L.K., GOETZ, E.J. & LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, **32**: 577-580, 1989.
- TAKEMURA, R. & WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.*, **246**(15): C1, 1984.
- THORNTON, A.J., STRIETER, R.M., LINDLEY, I. *et alii*. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J. Immunol.*, **144**(7): 2609, 1990.
- TRACEY, K.J., FONG, Y., HESSE, D.G., MANOGUE, R.K., LEE, A.T., KUO, G.C., LOWRY, S.F. & CERAMI, A. Anti-cachectin-TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, **330**: 662, 1987.
- TSUJIMOTO, M., YOKOTA, S., VILCEK, J. & WEISSMANN, G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**: 1094, 1986.
- UNANUE, E.R. Antigen presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**: 395, 1984.
- UNANUE, E.R. & ALLEN, P.M. The basis for immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, **236**: 551, 1987.
- VAN DAMME, J., VAN BEEUMEN, J., OPDENAKKER, G. & BILLIAU, A. A novel, NH₂-terminal sequence-characterised human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive and granulocytosis-promoting activity. *J. Exp. Med.*, **167**: 1364, 1988.

- VAN DAMME, J., DECOCK, B., CONINGS, R., LENAERTS, J.P., OPDENAKKER, G. & BILLIAU, A. The chemotactic activity for granulocytes produced by virally infected fibroblasts is identical to monocyte-derived interleukin 8. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 1189-1194, 1989.
- VAN FURTH, R., COHN, Z.A., HIRSCH, J.G. *et alii*. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor. *Bull. Who*, **46**: 845, 1972.
- VAN FURTH, R. Mononuclear phagocytes in inflammation. Em: Vane, J.R. & Ferreira, S.H. (editores). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50/1, Springer-Verlag, pp. 68, 1978.
- VAN FURTH, R. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology*, **161**: 178, 1982.
- VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Currents Topics in Pathology*, **79**: 125, 1988a.
- VAN FURTH, R. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. Em: Gallin, J.I., Goldstein, I.M. & Snyderman, R. (editores). *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, Raven Press, New York, pp. 281, 1988b.
- VIJAYAKUMAR, R.K., PALANIVEL, V. & MUTHUKKARUPPAN. Influence of carrageenan in peritoneal macrophages. *Immunology Letters*, **23**: 55, 1989.
- WAAGE, A. & BAKKE, O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology*, **63**: 299-302, 1988.
- WALZ, A., PEVERI, P., ASCHAUER, H. & BAGGIOLINI, M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**: 755, 1987.
- WEIR, D.M. Macrophages signal recognition. *Agents and Actions*, **15**: 3, 1984.
- WERB, Z., CHIN, J.R., TAKEMURA, R. *et alii*. The cell and molecular biology of apolipoprotein and synthesis by macrophages. *Biochemistry of macrophage: CIBA Foundation Symposium*, **118**: 155, 1986.
- WESTWICK, J., LI, S.W. & CAMP, R.D. New chemotactic peptides. *Immunol. Today*, **10**: 146, 1989.

- WHEELER, M.E., LUSCINSKAS, F.W., BEVILACQUA, M.P. & GIMBRONE JR, M.A. Cultured human endothelial cells stimulated with cytokines or endotoxin produce an inhibitor of leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.*, **82**: 1211, 1988.
- WHITE, M.V., YOSHIMURA, T., HOOK, W. *et alii*. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol. Lett.*, **22**: 151, 1989.
- YOKOTA, S., GEPPERT, T.D. & LIPSKY, P.E. Enhancement of antigen and mitogen - induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis-alpha. *J. Immunology*, **140**: 531, 1988.
- YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., TANAKA, S., ROBINSON, E.A., APPELLA, E., OPPENHEIM, J.J. & LEONARD, E.J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defence cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9233-9237, 1987a.
- YOSHIMURA, T., MATSUSHIMA, K., OPPENHEIM, J.J. & LEONARD, E.J. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin a (IL1). *J. Immunol.*, **139**: 788, 1987b.
- ZAMPRONIO, A.R., SILVA, C.A.A., SOUZA, G.E.P. *et alii*. Atividade pirogênica da IL-8 em ratos. Em: VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumos. Legis Summa. Ribeirão Preto, 1991, pp. 344.