

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA ESPECIAL DE FARMACOLOGIA**

**EFEITO INIBITÓRIO DA INTERLEUCINA-4 E  
INTERLEUCINA-13 SOBRE A HIPERALGESIA  
INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Berenice Borges Lorenzetti.

**FABIANE HIRATSUKA VEIGA**  
Florianópolis  
2000

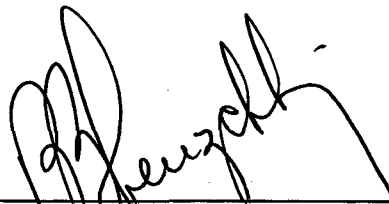
**“EFEITO INIBITÓRIO DA INTERLEUCINA-4 E  
INTERLEUCINA-13 SOBRE A HIPERALGESIA  
INFLAMATÓRIA”**

**POR**

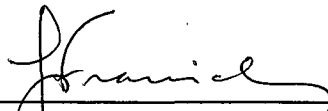
**FABIANE HIRATSUKA VEIGA**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**



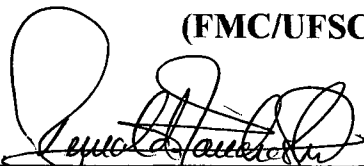
**Berenice Borges Lorenzetti  
(UFRR-Orientadora)**



**Janetti Nogueira de Francischi  
(UFMG -Membro Titular)**



**Giles Alexander Rae  
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Reinaldo Naoto Takahashi  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 21 de Julho de 2000.**

**Dedico este trabalho à minha mãe, Hamako,  
presença constante em meu coração  
e um grande exemplo a ser seguido.**

**Ao meu querido Paulo, pelo incentivo,  
companheirismo e por me ajudar  
a superar os obstáculos.**

**"No fim tudo dará certo,  
se não der,  
ainda não é o fim."**

**J. Bach**

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Berenice Borges Lorenzetti, por despertar meu interesse na pesquisa científica, bem como pela atenção e carinho dedicados ao longo destes anos ao meu desenvolvimento pessoal e profissional. Berê, estes foram os primeiros dos muitos anos que serão compartilhados;

Aos Professores Doutores Sérgio Henrique Ferreira e Fernando de Queiroz Cunha pelo fornecimento das drogas, tão necessárias à realização deste trabalho;

À Mani, pelo prazer de desfrutar de sua amizade;

À Candice e Joice, pelo companheirismo e colaboração durante a realização deste trabalho;

Aos Professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Prof. Dr. Aleksander Zampronio;

Ao Prof. Dr. César Cusatis por possibilitar a utilização da estrutura do Laboratório de Óptica de Raios-x e Instrumentação - LORXI do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná;

Aos Professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo conhecimento transmitido;

À Viviane pela agradável companhia nas intermináveis viagens;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Sílvia, pela qualidade de seu trabalho;

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina;

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
1.1 Neurônios aferentes nociceptivos.....	3
1.2 Sensibilização dos nociceptores e hiperalgisia.....	4
1.3 Transmissão nociceptiva.....	6
1.4 Cininas.....	7
1.5 Prostaglandinas.....	9
1.6 Catecolaminas.....	10
1.7 Citocinas.....	11
1.7.1 Citocinas Pró-inflamatórias.....	12
1.7.2 Citocinas Antiinflamatórias.....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Animais experimentais.....	28
3.1.1 Ratos atímicos.....	28
3.2 Teste Nociceptivo de Hiperalgisia Mecânica.....	29
3.3 Drogas.....	31
3.4 Citocinas.....	31
3.5 Anticorpos monoclonais.....	32
3.6 Depleção de mastócitos em patas de ratos.....	32
3.7 Delineamento dos procedimentos experimentais.....	33
3.8 Análise estatística dos resultados.....	35
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Efeito da IL-4 e IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ .....	37
4.2 Ausência de efeito da IL-4 e IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE $_2$ .....	44



4.3	Efeito da IL-4 e IL-13 administradas em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ e IL-8. ....	44
4.4	Potenciaiiização pelos anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4 ou para IL-13 das respostas hiperalgésicas induzidas por carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ , mas não por IL-1 $\beta$ e IL-8.....	52
4.5	Potenciaiiização pelo anticorpo monoclonal para IL-4 da hiperalgesia induzida por bradicinina em ratos atímicos (Nude Rowett). ....	63
4.6	Ausência de potenciaiiização pelo anticorpo monoclonal para IL-4 do efeito hiperalgésico induzido pela bradicinina em patas de ratos depletadas de mastócitos.....	63
4.7	Detecção da resposta hiperalgésica à dextrana através do anticorpo monoclonal para IL-4.....	63
4.8	Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por bradicinina em ratos atímicos.....	64
4.9	Efeito da depleção de mastócitos em patas de ratos Wistar sobre a potencialização da hiperalgesia induzida pela bradicinina através do anticorpo monoclonal para IL-13. ....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>RESUMO</b> .....	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

BK – bradicinina

Ca<sup>+2</sup> - íon cálcio

Cg – carragenina

CINC-1 – “cytokine induced neutrophil chemoattractant”

COX – ciclooxigenase

E.P.M. – erro padrão da média

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

GRO – “growth regulatory oncogene”

IFN - interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IL-1ra – antagonista de receptores de IL-1

IL-4R – receptor para interleucina-4

IL-13R – receptor para interleucina-13

i.pl. – intraplantar

kD – quilodáton

LPS - lipopolissacarídeo

µg – micrograma

$\mu$ l – microlitro

MIP - proteína inflamatória derivada de macrófagos

Na<sup>+</sup> - íon sódio

ng – nanograma

NGF – fator de crescimento do nervo

NOS – óxido nítrico sintetase

PG – prostaglandina

pg - picograma

RANTES – “regulated on activation normal T cell expressed and secreted”

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro

SNC – sistema nervoso central

TGF $\beta$  - fator de crescimento transformador  $\beta$

Th – célula T auxiliadora

TNF – fator de necrose tumoral

TXB – tromboxana do tipo B

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Esquema da possível cascata de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor .....16

Figura 2 - Esquema da possível cascata de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor, indicando os pontos de inserção da IL-10 e as etapas nas quais a participação da IL-4 e da IL-13 será investigada (?). ....24

Figura 3 - Esquema do aparelho usado para medir hiperalgesia mecânica.....30

Figura 4 - Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.....38

Figura 5 - Efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.....39

Figura 6 - Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina .....40

Figura 7 - Efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina .....41

Figura 8 - Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por TNF  $\alpha$ .....42

Figura 9- Efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por TNF  $\alpha$ ..... 43

Figura 10 - Ausência de efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>.....46

Figura 11 - Ausência de efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>.....47

Figura 12 - Efeito da IL-4 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ .....48

Figura 13 - Efeito da IL-13 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ .....49

Figura 14 - Efeito da IL-4 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-8.....50

Figura 15 - Efeito da IL-13 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-8.....51

Figura 16 - Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de carragenina .....	53
Figura 17 - Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de carragenina .....	54
Figura 18 - Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de bradicinina.....	55
Figura 19 - Efeito de anticorpos monoclonais para IL-13 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de bradicinina.....	56
Figura 20 - Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de TNF $\alpha$ .....	57
Figura 21 - Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 hiperalgisia induzida por uma pequena dose de TNF $\alpha$ .....	58
Figura 22 - Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de IL-1 $\beta$ .....	59
Figura 23 - Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de IL-1 $\beta$ .....	60
Figura 24 - Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de IL-8.....	61
Figura 25 - Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-13, sobre a hiperalgisia induzida por uma pequena dose de IL-8.....	62
Figura 26 - Efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 sobre a hiperalgisia induzida por bradicinina e dextrana.....	65
Figura 27 - Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 sobre a hiperalgisia induzida por bradicinina.....	66
Figura 28: Esquema da possível cascata de liberação de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor, indicando os pontos de inserção da IL-10, IL-4 e IL-13.....	81





## INTRODUÇÃO

Segundo WOOLF e SALTER (2000), a dor pode ser classificada em três categorias: fisiológica, inflamatória e neuropática. A dor fisiológica funciona como um sinal inicial, alertando o organismo para a presença de estímulos injuriantes. Este tipo de dor inicia-se nos terminais periféricos dos nociceptores, os quais inervam os tecidos e somente são ativados por estímulos nocivos, por exemplo, uma picada de agulha. A dor inflamatória origina-se a partir de danos teciduais provocados pela inflamação e a dor neuropática a partir de lesões no sistema nervoso. Ambas são caracterizadas por hipersensibilidade no local da injúria e tecido adjacente normal. A dor pode aumentar espontaneamente, pois estímulos que normalmente não produzem dor, passam a produzir (alodínia) e estímulos nocivos induzem dor mais intensa e prolongada (hiperalgesia) (para revisão ver WOOLF e SALTER, 2000).

A hipersensibilidade associada à dor é uma expressão da plasticidade neuronal, cuja duração é determinada por seqüências particulares de ativação, modulação ou modificação que podem ocorrer. Estas formas de plasticidade constituem um circuito contínuo das diversas reações dos neurônios em resposta a alterações em suas atividades ou em seus arredores. A dor não é uma consequência passiva da transferência de estímulos periféricos para o SNC, mas um processo ativo gerado parcialmente na periferia e parcialmente no SNC por múltiplas mudanças plásticas que, em conjunto, determinam a efetividade do sistema (para revisão ver WOOLF e SALTER, 2000).

### 1.1 Neurônios aferentes nociceptivos.

Distribuídos por todos os tecidos do organismo, existem receptores sensoriais, os quais são sensíveis a diferentes modalidades de estímulos. Dentre estes receptores, os nociceptores são terminações periféricas de neurônios bipolares, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes dorsais e gânglios cranianos. Receberam esta denominação porque respondem preferencialmente a estímulos nocivos ou a estímulos que se tornam nocivos se prolongados.

As fibras aferentes associadas aos nociceptores penetram na medula espinhal através das raízes dorsais, terminando na substância cinzenta do corno dorsal. Muitas dessas fibras são do tipo C não-mielinizadas com baixas velocidades de condução (< 2 m/s) e que podem responder a estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos. Outras são delicadas fibras mielinizadas (A $\delta$ ), com maiores velocidades de condução (2 a 30 m/s) (SIMONE e KAJANDER, 1997), mas que também respondem a estímulos periféricos semelhantes. Nociceptores capazes de responder a estímulos térmicos, mecânicos e químicos são denominados polimodais.

SCHAIBLE e SCHMIDT (1985) descreveram outra classe de nociceptores associados a fibras amielínicas de neurônios sensoriais primários, que não respondem a estímulos mecânicos ou térmicos de grande intensidade, mas que possuem sensibilidade química e respondem às modificações produzidas nos tecidos por processos patofisiológicos. Isto significa que, na presença de alterações teciduais como a inflamação, ocorre a liberação de mediadores químicos, e em decorrência, o recrutamento dessa classe de fibras aferentes que não respondem a estímulos nociceptivos em condições normais. Estes receptores têm sido denominados de aferentes silenciosos, nociceptores dormentes e aferentes

mecanicamente insensíveis e são encontrados em muitos tecidos, como a pele, articulações e vísceras (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1985; McMAHON e KOLTZENBURG, 1990; para revisão ver FLORÉZ, J., 1992).

## **1.2 Sensibilização dos nociceptores e hiperalgesia.**

Normalmente, quando as fibras aferentes C e A $\delta$  são ativadas por um estímulo breve e de alta intensidade, a dor resultante funciona como um aviso fisiológico. No entanto, durante o processo inflamatório, as fibras aferentes são ativadas por estímulos de menor intensidade e a dor produzida difere em qualidade e pode ser mais persistente. Várias mudanças operacionais na função do neurônio aferente e no processamento central da via nociceptiva podem contribuir para isto e estes eventos também podem ser considerados como uma resposta protetora fisiológica, uma vez que o sistema nociceptivo retorna ao seu estado normal assim que o dano tecidual seja reparado (para revisão ver DRAY, 1995).

Em condições de dor crônica, a dor pode ser espontânea, intermitente ou persistente e envolver mudanças complexas no processamento central e periférico do sinal nociceptivo. Nestas circunstâncias, a relevância fisiológica do sinal nociceptivo é menos clara e a função protetora da atividade aferente é obscura. A dor crônica pode estar associada com um processo inflamatório crônico, no qual a presença de dano ou lesão ocorre, mas também há condições nas quais nenhum processo patológico ou degenerativo pode ser encontrado (para revisão ver DRAY, 1995).

Na vasta maioria das condições dolorosas, tanto inflamatórias quanto neuropáticas, existem fases associadas da inflamação, nas quais uma variedade de

mediadores alteram as funções das fibras aferentes periféricas. Entre estas substâncias, encontramos a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienas, serotonina, histamina, substância P, tromboxanas, fator de ativação de plaquetas, prótons e radicais livres. Citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), e as neurotrofinas, como o fator de crescimento do nervo (NGF), também são produzidos durante a inflamação. Alguns destes agentes podem sensibilizar ou até mesmo ativar direta ou indiretamente os nociceptores (para revisão ver RAJA et al., 1989).

A sensibilização é definida como um desvio para a esquerda da função estímulo-resposta, que relaciona a magnitude da resposta neural (resposta da fibra nervosa) à intensidade do estímulo nociceptivo. A sensibilização é caracterizada por uma diminuição no limiar de excitabilidade, um aumento na resposta a estímulos supralimiais e atividade espontânea contínua. Fazendo uma associação, a hiperalgesia pode ser definida como um desvio para a esquerda da função estímulo-resposta, que relaciona a magnitude de dor (resposta do organismo) à intensidade do estímulo. As características da hiperalgesia são: um estado de sensibilidade alterado, diminuição no limiar doloroso, um aumento na dor induzida por estímulos supralimiais e dor espontânea.

A hiperalgesia não ocorre somente no local da injúria, mas também nas proximidades da área injuriada. A hiperalgesia que ocorre no local é denominada hiperalgesia primária e é caracterizada pela presença de dor aumentada a estímulos térmicos e mecânicos, enquanto aquela nas proximidades do tecido afetado é a hiperalgesia secundária (RAJA et al., 1984; DAHL et al., 1993; ALI et al., 1996; WARNCKE et al., 1997).

### 1.3 Transmissão nociceptiva.

Os axônios aferentes percorrem um caminho ininterrupto a partir de suas terminações nervosas nos tecidos periféricos até suas terminações sinápticas centrais na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os corpos celulares destas fibras situam-se ao longo deste caminho nos gânglios das raízes dorsais, próximos da espinha, ou nos gânglios dos nervos cranianos na base do crânio (DEVOR e SELTZER, 1989). Com relação aos terminais centrais, a maioria das fibras aferentes nociceptivas termina na região superficial do corno dorsal, com as fibras C e A $\delta$  terminando predominantemente nas lâminas I e II, mas com algumas fibras penetrando mais profundamente no corno dorsal (lâmina V) (DEVOR e SELTZER, 1989).

A geração de um impulso sensorial inicia-se quando um estímulo provoca aumento na permeabilidade da membrana das terminações sensoriais a vários íons, principalmente ao Na<sup>+</sup>, gerando potenciais de ação que se propagam e são transmitidos pelos nervos periféricos e cranianos aos núcleos na medula espinhal e tronco cerebral para o seu processamento neural. Nestes locais, estas fibras aferentes nociceptivas ou neurônios de primeira ordem efetuam sinapses com os neurônios de segunda ordem, após o que a informação ascende através de tratos nervosos específicos, passando por centros de processamento em vários núcleos até a convergência em populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo. Deste ponto, a informação neural se projeta para as áreas sensoriais do córtex cerebral, e suas várias características são integradas na experiência da percepção. Nestas estruturas superiores vários aspectos das sensações são avaliados, incluindo a qualidade, intensidade, localização, duração e o seu aspecto

emocional ou afetivo, diferenciando a sensação dolorosa da percepção (para revisão ver NOBACK et al., 1996).

#### 1.4 Cininas.

As cininas são potentes peptídeos bioativos formados pela ação enzimática das calicreínas sobre substratos endógenos denominados cininogênios. A calidina é liberada a partir do cininogênio de baixo peso molecular, pela ação da calicreína tecidual e, a bradicinina, a partir do cininogênio de alto peso molecular, pela ação da calicreína plasmática (para revisão ver BHOOLA et al., 1992).

As cininas exercem vários efeitos pró-inflamatórios, incluindo a liberação de prostanóides, citocinas e radicais livres a partir de diferentes tipos celulares. Elas também estimulam neurônios simpáticos pós-ganglionares, afetando o calibre dos vasos sanguíneos. As cininas desgranulam mastócitos, os quais liberam histamina e outros mediadores inflamatórios. Além disso, elas causam extravasamento plasmático decorrente da contração das células endoteliais. São potentes substâncias algogênicas e induzem dor pela estimulação direta dos nociceptores na pele, articulações e músculos, além de sensibilizá-los a estímulos mecânicos e térmicos (para revisão ver DRAY, 1995). A ação algica da bradicinina é potencializada pelas tromboxanas, prostaglandinas e serotonina (para revisão ver BHOOLA et al., 1992).

Estudo realizado por STERANKA et al. (1988), utilizando cobaias, confirmou a presença de receptores para bradicinina em sítios envolvidos na nocicepção: camadas superficiais da medula espinhal, fibras amielínicas de pequeno calibre e pequenos neurônios nos gânglios sensoriais. No mesmo estudo, foram

demonstradas atividades analgésicas dos antagonistas de receptores para bradicinina. Baseados nestes dados, os autores sugerem que a bradicinina é um mediador fisiológico da nocicepção.

O mecanismo de ação hiperalgésica da bradicinina foi estudado por FERREIRA et al. (1993), e os resultados demonstraram que a mesma é um potente agente hiperalgésico e está presente na inflamação induzida por estímulos inflamatórios, como carragenina e LPS. Além disso, demonstraram que a administração local de bradicinina em ratos induz a liberação de  $TNF\alpha$ . Estes dados corroboraram os achados que demonstram que a bradicinina induz a produção de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  em cultura de macrófagos murinos (TIFFANY e BURCH, 1989) e, em conjunto, podem sugerir que a mesma inicia a liberação de uma cascata de citocinas que medeiam a hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina e LPS (Figura 1).

Atualmente existem pelo menos dois tipos de receptores para bradicinina. Os receptores  $B_2$  são constitutivos e expressos em vários tecidos, enquanto os receptores  $B_1$  possuem distribuição restrita e são expressos quase que exclusivamente em tecidos inflamados (para revisão ver MARCEAU et al., 1998; JAGGAR et al., 1998). Vários estudos têm sido realizados para avaliar o envolvimento destes receptores em diferentes modelos de hiperalgisia (JAGGAR et al., 1998; TONUSSI e FERREIRA, 1997; PERKINS et al., 1993).

No teste de incapacitação articular em ratos, foi avaliada a resposta nociceptiva induzida pela bradicinina. Demonstraram que nesta resposta a sensibilização é mediada por receptores  $B_2$  e a nocicepção é mediada por receptores  $B_1$  (TONUSSI e FERREIRA, 1997). Corroborando estes resultados, POOLE et al. (1999) demonstraram que tanto os receptores  $B_2$  quanto  $B_1$  são importantes na mediação

da resposta hiperalgésica induzida pela bradicinina e por drogas que estimulam a liberação de bradicinina em modelos de dor aguda.

### 1.5 Prostaglandinas.

As PGs são sintetizadas a partir do ácido araquidônico em decorrência da atividade enzimática da ciclooxigenase (COX). Há duas isoformas de COX, a COX-1 e, a COX-2. Ambas podem ser induzidas em certas situações, mas, em geral, a COX-1 é expressa constitutivamente e a COX-2 é induzida (para revisão ver MARNETT e KALGUTKAR, 1999). A forma constitutiva é expressa em muitos tecidos, como estômago, rim e musculatura lisa vascular. É importante ressaltar o fato de que a COX-1 é amplamente expressa no trato gastrointestinal, onde acredita-se que ela tenha função citoprotetora gástrica. A COX-2 não é detectada ou aparece somente em baixas concentrações no trato gastrointestinal (para revisão ver MARNETT e KALGUTKAR, 1999). Esta isoforma pode ser induzida por citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , tanto em células residentes quanto migratórias (SEIBERT et al., 1994; BAKHLE e BOTTING, 1996).

As PGs não causam dor quando injetadas intradermicamente em humanos, mas causam hiperalgesia (CRUNKHORN e WILLIS, 1971; COLLIER et al., 1972). As PGs sensibilizam os nociceptores a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (MARTIN et al., 1987; DAVIS et al., 1993; KUMAZAWA et al., 1994).

FERREIRA et al. (1978) compararam os efeitos da PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> quanto ao tempo de latência e duração do efeito hiperalgésico. Os resultados mostraram que a PGI<sub>2</sub>



tem tempo de latência e duração do efeito hiperalgésico mais curtos do que os da PGE<sub>2</sub>.

As PGs induzem sensibilização dos nociceptores por atuarem sobre a enzima adenilatociclase, num processo dependente de síntese protéica (LORENZETTI e FERREIRA, 1981). Isto produz um aumento dos níveis de AMPc/Ca<sup>+2</sup> no nociceptor, resultando em uma facilitação do mesmo para a passagem do estímulo nervoso, gerando assim, um quadro de sensibilização do nociceptor (FERREIRA e NAKAMURA, 1979).

### **1.6 Catecolaminas.**

Vários estudos farmacológicos, fisiológicos e evidências clínicas demonstraram a influência da modulação simpática na sensibilização de nociceptores. Baseados no relato de WIENSENFELD e HALLIN (1984), NAKAMURA e FERREIRA (1987), demonstraram que noradrenalina, dopamina e SKF38393 (agonista seletivo de receptores D<sub>1</sub> para dopamina) podem sensibilizar diretamente os nociceptores, através da ativação da enzima adenilatociclase, com conseqüente aumento dos níveis de AMPc/Ca<sup>+2</sup>. Os mesmo autores demonstraram que a depleção das aminas simpatomiméticas periféricas realizada pelo tratamento crônico com guanetidina, o tratamento com β-bloqueadores ou com um antagonista seletivo de receptores D<sub>1</sub> para dopamina (SCH 23390) reduzem significativamente a hiperalgisia induzida pela carragenina. Demonstraram, ainda, que o bloqueio da captação-1 pela cocaína potencializa a hiperalgisia induzida pela carragenina e aminas simpatomiméticas. Em conjunto, estes dados sugerem a existência de um componente simpático na

hiperalgesia induzida por carragenina. Este componente pode ser predominante em condições dolorosas insensíveis ao tratamento com antiinflamatórios não esteroidais.

Sendo assim, outra forma de prevenir a dor inflamatória é via inibição do componente simpático. Segundo HANNINGTON (1974), as aminas simpatomiméticas medeiam alguns quadros de dor periférica no homem, sendo que, em algumas patologias, há uma notável relação entre a presença de hiperalgesia e a analgesia obtida pelo bloqueio simpático local com guanetidina. Em humanos, existem doenças neurológicas que podem ser acompanhadas por quadros de dor que são controlados por simpatolíticos, incluindo os  $\beta$ -simpatolíticos (VERRIL, 1984).

SATO et al. (1994) demonstraram a presença de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos associados a fibras C polimodais. Os autores sugerem que estes receptores podem ter importante participação na excitação dos nociceptores cutâneos induzida pela norepinefrina em ratos com inflamação crônica.

### **1.7 Citocinas.**

Embora as citocinas constituam um grupo diversificado de proteínas, um certo número de propriedades é compartilhado por estas moléculas (ABBA et al., 1999), quais sejam:

- 1) As citocinas são produzidas durante as fases de ativação e efetuação da imunidade inata e da imunidade específica e servem para mediar e regular as respostas imunes e inflamatórias;
- 2) A secreção de citocinas é um evento rápido e autolimitado;
- 3) Muitas citocinas individuais são produzidas por diversos tipos celulares;

- 4) As citocinas atuam sobre tipos celulares diferentes;
- 5) As citocinas costumam exercer múltiplos efeitos sobre a mesma célula alvo;
- 6) As ações das citocinas são muitas vezes redundantes;
- 7) Algumas citocinas às vezes influenciam a síntese e a ação de outras;
- 8) As citocinas, como outros hormônios peptídicos, iniciam sua ação por ligação a receptores específicos nas superfícies das células-alvo;
- 9) A expressão de muitos receptores de citocinas é regulada por sinais específicos;
- 10) A maioria das respostas celulares às citocinas requer nova síntese de RNAm e de proteínas;
- 11) Para muitas células-alvo, as citocinas atuam como reguladoras da divisão celular, isto é, como fatores de crescimento.

### **1.7.1 Citocinas Pró-inflamatórias.**

As citocinas  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 são liberadas por uma grande variedade de células do sistema imune e podem produzir intensa hiperalgesia. Esta hiperalgesia é mediada indiretamente pela ativação dos dois componentes principais da dor inflamatória: o componente prostanóide e o componente simpático, que são capazes de sensibilizar os nociceptores, uma vez que a liberação destes mediadores é decorrente da liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-8, respectivamente (FERREIRA et al., 1978; NAKAMURA e FERREIRA, 1987; FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992).

Estudos realizados por BERNHEIM et al. (1980) demonstraram a liberação de PGs em resposta à IL-1. Baseados neste fato e devido à capacidade das PGs sensibilizarem os nociceptores, FERREIRA et al. (1988) investigaram se a IL-1 $\beta$  seria capaz de induzir hiperalgesia, utilizando o teste de hiperalgesia mecânica. Nestes estudos, os autores demonstraram que a IL-1 $\beta$  induz hiperalgesia de maneira dose-dependente e que o pré-tratamento das patas com indometacina (inibidor da COX) previne a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$ . Os autores sugeriram que a liberação local de produtos da COX (como as PGs) induzida pela IL-1 $\beta$  nas proximidades dos nociceptores contribui para a hiperalgesia.

Segundo CUNHA et al. (1991), a IL-8 também pode sensibilizar os nociceptores a estímulos mecânicos, causando hiperalgesia de maneira dose-dependente. A eficácia dos tratamentos realizados com antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, como atenolol e propranolol, antagonista seletivo de receptores D<sub>1</sub> para dopamina (SCH 23390) e guanetidina, bem como a ausência de bloqueio pelo tratamento com indometacina, sugerem o envolvimento do componente simpático na hiperalgesia induzida pela IL-8. Esta hipótese foi reforçada pelos seguintes resultados: 1) a hiperalgesia induzida pela carragenina foi parcialmente inibida pelo tratamento com um soro anti-IL-8; 2) a associação do soro anti-IL-8 com atenolol não obteve efeitos maiores do que aqueles induzidos por cada um destes agentes separadamente; e 3) a associação do soro anti-IL-8 com indometacina aboliu completamente a hiperalgesia induzida por carragenina. Dessa forma, a IL-8 foi o primeiro mediador endógeno a ser identificado como um indutor hiperalgésico que atua através da ativação do sistema nervoso autonômico simpático, independentemente do envolvimento de PGs (CUNHA et al., 1991).

Estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado a participação adicional de outras citocinas na ativação do componente simpático da dor inflamatória. Estas citocinas possuem atividades quimiotáticas sobre diferentes tipos celulares e, por isso, são chamadas de quimiocinas. As quimiocinas estudadas foram:  $GRO\alpha$ , RANTES e CINC-1. Os resultados demonstraram que elas ativam o componente simpático da dor, pois o tratamento com atenolol a inibiu completamente, enquanto o tratamento com indometacina não alterou a hiperalgisia induzida por estes estímulos (artigo em preparação). Embora o perfil de atividades destas quimiocinas seja semelhante ao perfil da IL-8 (que na verdade também é uma quimiocina), a ação delas independe da participação da IL-8, pois o tratamento com anticorpo monoclonal para IL-8 não inibe os efeitos induzidos por  $GRO\alpha$ , RANTES ou CINC-1 (artigo em preparação).

A injeção local de IL-6 induz hiperalgisia mecânica de maneira dose-dependente. Este efeito é bloqueado pelo pré-tratamento com indometacina, mas não é afetado pelo pré-tratamento com atenolol, sugerindo que a IL-6, da mesma forma que a IL-1 $\beta$ , atue via ativação do componente de PGs. A hiperalgisia induzida pela IL-6 também foi inibida pelo pré-tratamento com um soro anti-IL-1 $\beta$ , indicando que a IL-6 induz a liberação de IL-1 $\beta$  durante a hiperalgisia inflamatória (CUNHA et al., 1992).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) é uma potente citocina pró-inflamatória, capaz de induzir dor e hiperalgisia (CUNHA et al., 1992; PERKINS e KELLY, 1994; WOOLF et al., 1997). Estes efeitos parecem ser decorrentes de sua ação sensibilizante sobre os neurônios primários aferentes e da indução da expressão de outras proteínas pró-inflamatórias (JUNGER e SORKIN, 2000). Durante a resposta

imune, inflamação ou injúria, o  $\text{TNF}\alpha$  é sintetizado e liberado por vários tipos celulares, como queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos e macrófagos infiltrantes (para revisão ver JUNGER e SORKIN, 2000).

O  $\text{TNF}\alpha$  é considerado citocina pivô na cascata de liberação dos mediadores inflamatórios (Figura 1), uma vez que a administração de um estímulo inflamatório, como a carragenina, induz a produção de  $\text{TNF}\alpha$  e este estimula a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ , que ativam o componente de PGs e IL-8, que, por sua vez, ativa o componente simpático. Esta seqüência de liberação de citocinas que ocorre durante a hiperalgesia foi investigada com o uso de soros anti-citocinas (CUNHA et al., 1992). Com a metodologia "tail flick" foi demonstrado que a hiperalgesia induzida por LPS também parece ser mediada por  $\text{TNF}\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e que o efeito do  $\text{TNF}\alpha$  é mediado pela IL-1 $\beta$  (WATKINS et al., 1995).

Tomando por base os dados descritos anteriormente, uma possível seqüência de liberação de citocinas e outros mediadores envolvidos na hiperalgesia inflamatória é proposta na literatura (Figura 1).

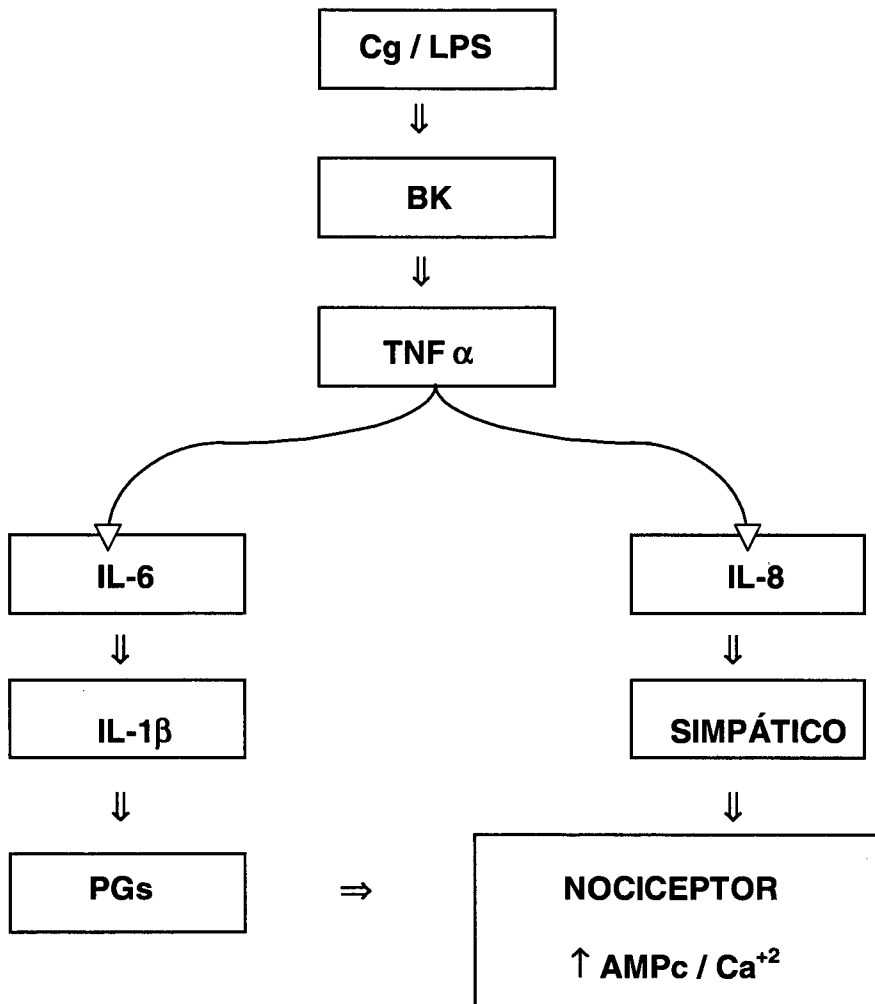


Figura 1 - Esquema da possível cascata de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor.

### 1.7.2 Citocinas Antiinflamatórias.

Na última década um grupo de citocinas que possuem atividade inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias tem sido descrito. As principais citocinas deste grupo são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$ .

A IL-10 é uma citocina de 18 kD produzida por macrófagos ativados, por alguns linfócitos e por alguns tipos de células não-linfocíticas (como os queratinócitos). As principais atividades da IL-10 consistem na inibição da produção de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e quimiocinas) pelos macrófagos, bem como das funções acessórias dos macrófagos na ativação das células T (ABBA et al., 1999). Além disso, a IL-10 inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos polimorfonucleares humanos (CASSATELLA et al., 1993).

POOLE et al., (1995) investigaram o efeito da IL-10 sobre as atividades hiperalgésicas da carragenina, bradicinina, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE $_2$ . Os resultados mostraram que a hiperalgesia induzida por carragenina e bradicinina foi inibida de maneira dose-dependente pelo pré-tratamento com IL-10. As respostas hiperalgésicas ao TNF $\alpha$  e IL-6, mas não à IL-8 e PGE $_2$ , foram inibidas pelo pré-tratamento com IL-10. Estes dados eram esperados, pois a atividade hiperalgésica do TNF $\alpha$  depende da indução de IL-1 $\beta$  e IL-8 e a IL-10 inibe a produção de citocinas. A atividade da IL-6 também é mediada por outra citocina, a IL-1 $\beta$ . Pelo contrário, a IL-8 induz aminas simpatomiméticas hiperalgésicas, que sensibilizam diretamente o nociceptor. A PGE $_2$  também sensibiliza os nociceptores, e esta ação é insensível à inibição pela IL-10 (estes dados obtidos estão de acordo com a cascata de liberação de mediadores, proposta na Figura 1).



Um resultado surpreendente foi a capacidade da IL-10 em inibir os efeitos da IL-1 $\beta$ . A IL-1 $\beta$  estimula a produção de PGs, as quais sensibilizam diretamente o nociceptor, ou seja, a IL-1 $\beta$  induz hiperalgesia por um mecanismo que não requer a produção de citocinas pró-inflamatórias sensíveis à IL-10. Além disso, experimentos *in vitro* utilizando células mononucleares periféricas humanas estimuladas com IL-1 $\beta$  ou LPS demonstraram que a IL-10 inibe de maneira dose-dependente a produção de PGE<sub>2</sub> (POOLE et al., 1995).

A IL-10 endógena tem papel significativo, limitando a hiperalgesia inflamatória mediada por citocinas e isto é reforçado pelo fato de que, em ratos, a neutralização da IL-10 endógena por anticorpos monoclonais anti-IL10 potencializou as respostas hiperalgésicas induzidas por carragenina e TNF $\alpha$ . Estes dados sugerem que a IL-10 bloqueia a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e bradicinina por dois mecanismos: inibição da produção de citocinas e inibição da produção de PGE<sub>2</sub> induzida por IL-1 $\beta$ , este último efeito parece ser resultado da supressão, pela IL-10, da expressão da prostaglandina H sintetase-2 (COX-2) (POOLE et al., 1995).

O TGF $\beta$  atua sobre muitos tipos celulares diferentes. Esta propriedade é designada pleiotropismo. Esta citocina é importante porque antagoniza muitas das respostas pró-inflamatórias dos linfócitos. Além disso, age sobre leucócitos polimorfonucleares e células endoteliais, em grande parte para contrabalançar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Segundo AHMAD et al. (1997), o TGF $\beta$  é uma potente citocina antiinflamatória que pode modificar o crescimento, a diferenciação celular e ainda, diminuir a produção de IL-2 em ratos durante a septicemia. Em cultura de fibroblastos estimulados por IL-1 $\beta$ , o TGF $\beta$  pode aumentar ou diminuir a produção de IL-6, dependendo da concentração de IL-1 $\beta$  utilizada para estimular as

células (ELIAS et al., 1991). Em cultura de macrófagos alveolares expostos a pó de sílica, o  $TGF\beta_1$  mostrou-se um importante regulador da liberação de eicosanóides  $TXB_2$  e  $PGE_2$ , sendo que o  $TGF\beta_1$  tanto endógeno quanto exógeno regula a produção de  $TXB_2$ , mas somente o  $TGF\beta_1$  endógeno apresentou importante efeito regulador sobre a produção de  $PGE_2$  (ORLINSKA e KUHN, 1995).

A interleucina-4 foi inicialmente identificada como uma citocina derivada de células T auxiliares, com aproximadamente 20 kD. Foi originalmente descrita (e chamada de fator-1 de estimulação de células B) por sua habilidade em estimular células B ativadas por um complexo anti-IgG a entrarem na fase S do ciclo celular (HOWARD et al., 1982). As principais fontes de IL-4 são os linfócitos T  $CD4^+$ , especificamente os da subpopulação Th2. Os mastócitos e os basófilos ativados, bem como algumas células T  $CD8^+$ , são também capazes de produzir IL-4 (RYAN et al., 1997; ABBAS et al., 1999). A produção de IL-4 é rápida e transitória, com níveis detectáveis em 1 a 5 h e perda da expressão após 24 a 48 h (RYAN, 1997).

A IL-4 exerce efeitos pleiotrópicos que favorecem a resposta humoral (PAUL e OHARA, 1987). Certamente, o efeito mais importante da IL-4 é a sua participação no desenvolvimento de células T. Estudos realizados com camundongos demonstraram que as células Th podem ser divididas em dois subgrupos: aquelas que produzem IL-2, interferon  $\gamma$ , fator de necrose tumoral  $\beta$  e aumentam a imunidade mediada por células (células Th1) e aquelas que produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e favorecem a resposta humoral, incluindo a produção de IgE (células Th2). A IL-4 direciona o desenvolvimento da linhagem Th2 (RYAN, 1997).

A IL-4 induz a produção de IgE e  $IgG_4$  por células B, aumenta a expressão de CD23, induz antígenos do complexo principal de histocompatibilidade, IL-4R, CD40 e

IL-2R $\beta$ . Em resposta à IL-4, os macrófagos aumentam a expressão de CD23 e a habilidade de apresentação de antígenos, entretanto, as respostas inflamatórias mediadas pelos macrófagos são inibidas, com a diminuição da produção de IL-1, IL-6, IL-8, TNF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, óxido nítrico e PGE<sub>2</sub>. As células endoteliais respondem à IL-4 com aumento de expressão da molécula de adesão vascular 1, enquanto diminui a expressão da molécula de adesão intercelular 1 e da molécula de adesão endotelial 1 (RYAN, 1997).

A IL-4 inibe a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$  (LORD e LAMB, 1996; TUNON de LARA et al., 1994). Além disso, a IL-4 pode suprimir respostas de hipersensibilidade tardia, como demonstrado em experimentos com animais ou humanos (ROCKEN et al., 1996), possivelmente devido à sua capacidade de induzir respostas das células Th2.

Estudos têm demonstrado que, em adição ao seu papel como inibidora da síntese de citocinas inflamatórias, a IL-4 também inibe a indução de COX-2, com conseqüente redução na produção de PGs (SEITZ et al., 1994; ENDO et al., 1996). Ainda, em experimentos com culturas de macrófagos estimulados com IFN $\gamma$  ou LPS, a IL-4 inibiu a produção de óxido nítrico, possivelmente pela inibição da atividade da enzima NOS (AL-RAMADI et al., 1992; LIEW et al., 1989; MARU e JACKSON, 1996).

Estudos realizados por HART et al. (1989) demonstraram que a IL-4 e a dexametasona inibiram em grau similar os níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  liberados por monócitos em resposta ao LPS. Os autores sugerem que a IL-4 ou agonistas do receptor para a IL-4 possam ser utilizados terapeuticamente em conjunto, com doses menores de corticosteróides do que as atualmente utilizadas.

A interleucina-13 é uma citocina de 15 kD, com quatro  $\alpha$ -hélices, produzida por diferentes tipos celulares. Ela imita os efeitos da IL-4 em células não-linfóides, mas não substitui a IL-4 como um fator de diferenciação ou de crescimento para as células T ou B. As ações da IL-13 na célula endotelial, as quais incluem indução da molécula 1 de adesão à célula vascular e a produção de quimiocinas CC podem contribuir para o recrutamento de eosinófilos nos tecidos durante as reações imunes mediadas por células Th2 (ABBAS et al., 1999).

De uma maneira dose-dependente, a IL-13 aumenta a expressão dos antígenos da classe II do complexo principal de histocompatibilidade, CD13 E CD23, enquanto a expressão de CD64, CD32, CD16 e CD14 é diminuída (para revisão ver ZURAWSKI e VRIES, 1994).

Em monócitos humanos estimulados com LPS, a produção e a expressão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 $\alpha$ , GRO $\beta$  e TNF $\alpha$ , foram diminuídas com o tratamento com IL-13, enquanto a secreção do antagonista de receptor para a IL-1 (IL-1ra) foi aumentada (MINTY et al., 1993; de WALL MALEFYT et al., 1993). Efeitos semelhantes foram observados para a IL-4 e IL-10 (de WALL MALEFYT et al., 1991).

As funções antiinflamatórias da IL-13 parecem ser cruciais em certas condições clínicas, como a artrite reumatóide (WILLIANS et al., 1992) e o choque séptico (MUCHAMUEL, et al., 1997; MATSUKAWA et al., 2000). Nesta última condição, a IL-13 confere proteção contra a endotoxemia letal induzida por LPS ou a peritonite séptica induzida por ligação e perfuração cecal em camundongos, possivelmente pela modulação das respostas inflamatórias via inibição das produção

de citocinas e quimiocinas inflamatórias nos tecidos (MUCHAMUEL, et al., 1997; MATSUKAWA et al., 2000).

Além de seu efeito sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias, a IL-13 mostrou-se um potente inibidor da expressão da COX-2 em monócitos humanos estimulados com LPS (ENDO et al., 1996). Tanto em fibroblastos sinoviais em repouso, como estimulados por  $TNF\alpha$ , a IL-13 inibiu de maneira significativa a liberação de  $PGE_2$  (SEITZ et al., 1996).

As similaridades nas funções biológicas da IL-13 e IL-4 são decorrentes das homologias seqüenciais e estruturais e podem ser explicadas pela observação de que seus receptores compartilham um componente comum. Os receptores para a IL-4 (IL-4R) e para a IL-13 (IL-13R) são multiméricos e compartilham pelo menos uma cadeia, chamada de IL-4R  $\alpha$ . Estudos recentes têm demonstrado a existência de dois tipos de IL-4R: um constituído pela IL-4R  $\alpha$  e a cadeia  $\gamma$ , e o segundo constituído pelo IL-4R  $\alpha$  e o IL-13R  $\alpha 1$ , envolvido na transdução de sinais tanto da IL-4 quanto da IL-13. Receptores específicos para a IL-13 são resultados da associação entre a IL-4R  $\alpha$  e o IL-13R  $\alpha 2$  ou entre dois IL-13R  $\alpha$  (para revisão ver CHOMARAT e BANCHEREAU, 1998; CALLARD et al., 1996; MURATA et al., 1998).

Apesar destas similaridades, as atividades biológicas da IL-13 são mais restritas do que aquelas da IL-4, porque a IL-13 não age sobre células T humanas e murinas, devido à falta de receptores para a IL-13 nos linfócitos T dessas espécies (para revisão ver CHOMARAT e BANCHEREAU, 1998).

Monócitos ativados produzem grandes quantidades de IL-10, que agem de maneira autócrina, suprimindo a produção de outras citocinas. A IL-13 e a IL-4

continuam a exercer potentes efeitos inibitórios sobre a produção de citocinas por monócitos ativados, mesmo em presença de anticorpos monoclonais para IL-10, sugerindo que os efeitos inibitórios da IL-13 e IL-4 não estão relacionados com a produção endógena de IL-10 (para revisão ver ZURAWSKI e VRIES, 1994).

A partir dos efeitos descritos para a IL-10, podemos incluí-la na seqüência de liberação das citocinas que induzem hiperalgesia, apresentada na Figura 1 e, dessa forma, teremos o esquema da Figura 2. A Figura 2 também indica possíveis posições onde poderiam ser inseridas a IL-4 e a IL-13. O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de investigar estes possíveis pontos de inserção destas citocinas.

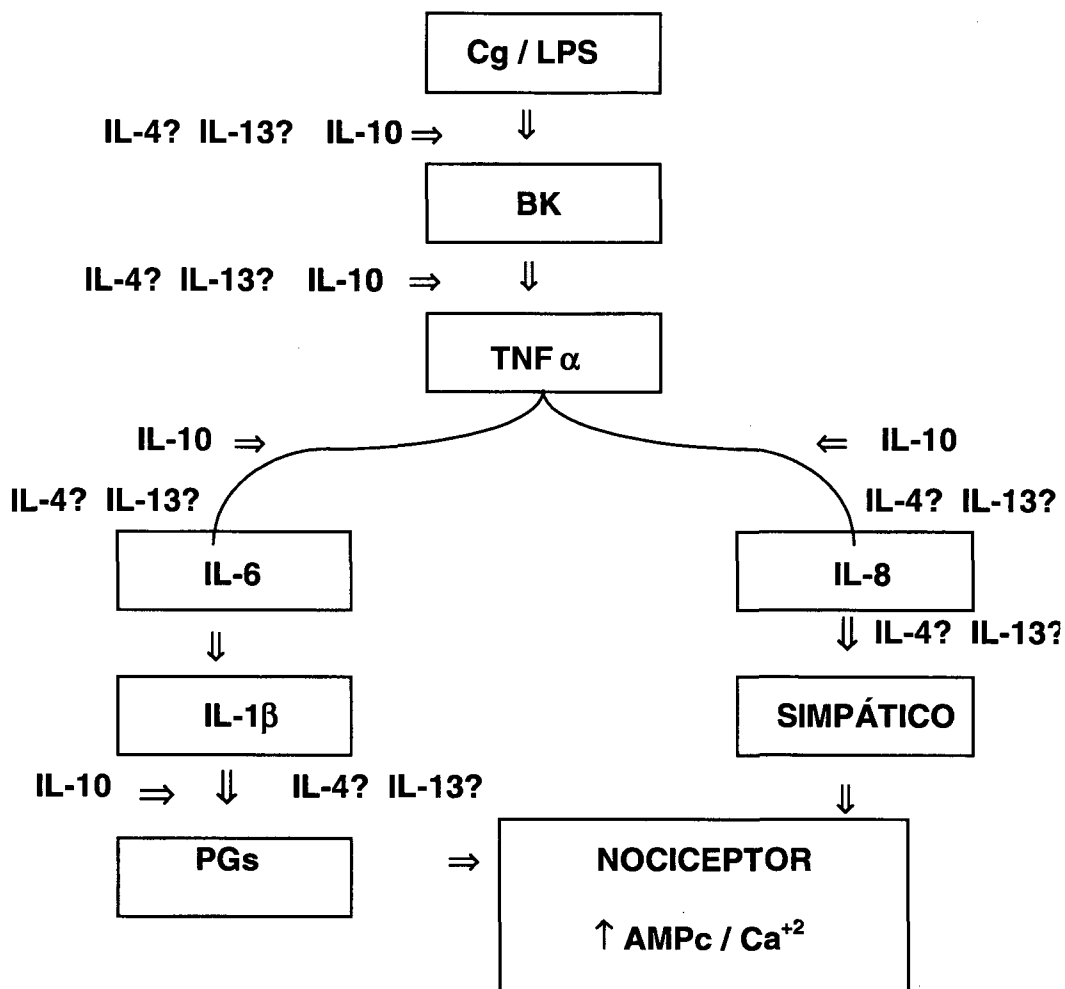


Figura 2 - Esquema da possível cascata de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor, indicando os pontos de inserção da IL-10 e as etapas nas quais a participação da IL-4 e da IL-13 será investigada (?).

**OBJETIVOS**

---



## 2 OBJETIVOS

Nossos objetivos no presente trabalho foram investigar:

- 1) os efeitos da IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, bradicinina, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>;
- 2) o papel da IL-4 e IL-13 endógenas durante a hiperalgesia, utilizando, para isto, anticorpos monoclonais específicos;
- 3) a origem celular da IL-4 e IL-13 durante a hiperalgesia inflamatória.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais.**

Em nossos experimentos foram utilizados ratos machos Nude-Rowett e Wistar. Os ratos Wistar foram provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais pesavam entre 130 a 180 g e permaneciam no mínimo 2 dias no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná antes dos experimentos, com livre acesso a água e ração, ciclo claro/escuro de 12/12 h e temperatura controlada (22 a 25°C). Para a realização dos experimentos, os animais foram transferidos ao laboratório e aguardou-se cerca de 2 h para a ambientação dos mesmos.

##### **3.1.1 Ratos atímicos**

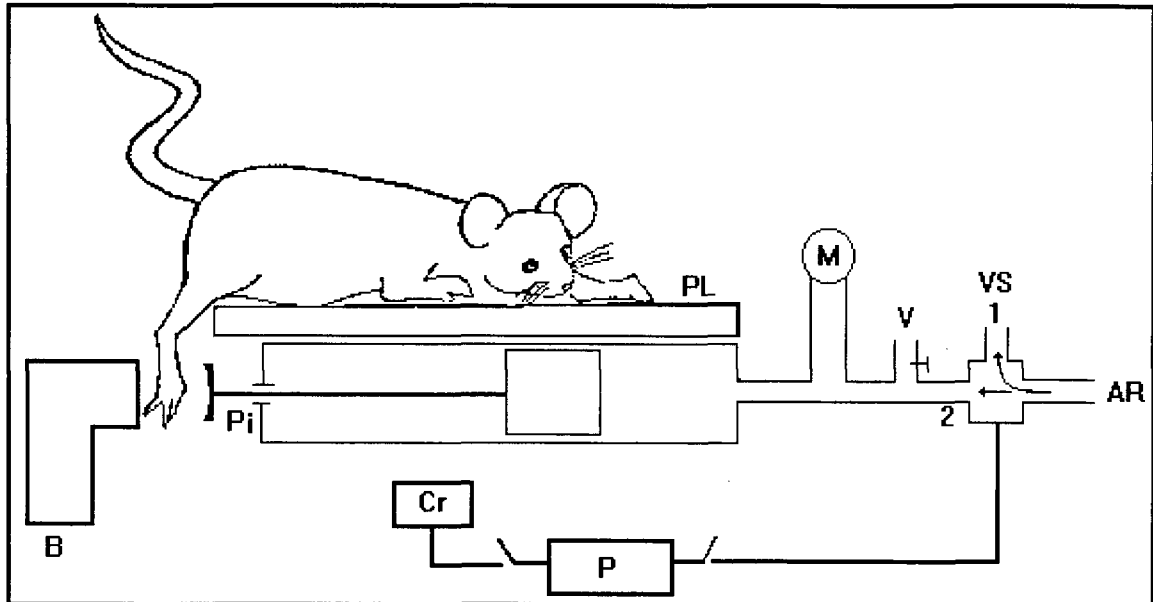
Os ratos machos Nude-Rowett foram provenientes do Instituto Butantã. A ausência de timo nestes animais foi confirmada por análise histopatológica e pelo ensaio de proliferação de esplenócitos utilizando concavalina- A (Con-A). Para ratos Wistar, as respostas proliferativas (incorporação de timidina tritiada, contagens por minuto (c.p.m.)) para a Con-A (5 µg/ml) foram: somente meio de cultura =  $1.320 \pm 140$  c.p.m., Con-A =  $12.316 \pm 940$  c.p.m. e para os ratos Nude-Rowett, somente meio de cultura =  $1.050 \pm 128$  c.p.m., Con-A =  $970 \pm 90$  c.p.m. (CUNHA et al., 1999).

Neste estudo, os ratos atímicos foram utilizados para investigar se os linfócitos eram o tipo celular responsável pela liberação local de IL-4 ou IL-13. Avaliou-se

então, nestes animais, o efeito do pré-tratamento com anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina.

### **3.2 Teste Nociceptivo de Hiperalgesia Mecânica.**

Para a avaliação da hiperalgesia utilizou-se uma modificação da técnica de RANDALL e SELITTO (1957), realizada por FERREIRA et al. (1978). O esquema do aparelho utilizado nesta metodologia é apresentado na Figura 1. O animal é colocado sobre uma plataforma (PL) em posição de decúbito ventral. Uma das mãos do experimentador fica sobre o dorso do animal mantendo-o sobre o aparelho e a outra mão posiciona uma das patas posteriores entre a plataforma e a barra (B). Quando o experimentador aciona o pedal (P), um cronômetro digital é simultaneamente ativado. O ar proveniente de um compressor é dirigido para o sentido 1 e ao acionar o pedal, aciona-se a válvula solenóide, que direciona o ar para dentro da seringa de teflon (sentido 2), empurrando o êmbolo com uma pressão constante de 20 mmHg (indicada pelo manômetro, M) contra a pata. Esta pressão é controlada através da válvula de escape (V). O pedal é desativado pelo experimentador e a pressão interrompida quando o animal apresenta o quadro característico da reação de dor, caracterizado por diminuição dos movimentos de fuga, seguido de alterações na frequência respiratória, o aparecimento eventual de fasciculações (sucessivas ondas de contração muscular) no dorso e o deslocamento discreto da cabeça do animal em direção à pata.



**Figura 3: Esquema do aparelho usado para medir hiperalgesia mecânica.** O rato é colocado sobre a plataforma (PL) e sua pata posicionada entre a mesma e a barra (B). O ar é pressionado constantemente para dentro do sistema, mas a válvula solenóide (VS) normalmente dirige-o na direção 1. O pedal (P) ativa simultaneamente um cronômetro elétrico (Cr) e a válvula solenóide, dirigindo o fluxo de ar para dentro da seringa de teflon (direção 2). O aumento de pressão empurra o pistão (Pi) contra a pata. A pressão final dentro do sistema (indicada pelo manômetro, M) permanece no valor desejado através da válvula de escape (V).

A intensidade de hiperalgesia é expressa como a diferença (delta;  $\Delta$ ) entre a latência (tempo que o animal demora para apresentar a reação nociceptiva) basal (antes de qualquer injeção) e a latência verificada 3 h após a injeção dos estímulos hiperalgésicos.

A latência basal (ou tempo de reação) em animais normais varia em torno de 30 s. Uma diminuição neste tempo ocasionada pela injeção de estímulos hiperalgésicos (latência pós-estímulos) indica o desenvolvimento de hiperalgesia. Portanto, a intensidade de hiperalgesia é quantificada através da seguinte fórmula:

$\Delta$  tempo de reação (segundos) = latência basal - latência 3 h após a injeção dos estímulos.

### **3.3 Drogas**

Foram utilizadas as seguintes drogas: carragenina (FMC Corporation, Philadelphia, E.U.A.), prostaglandina E<sub>2</sub>, bradicinina, dextrana e composto 48/80 (Sigma Chemical Co., St Louis, E.U.A.).

Todas as drogas utilizadas neste trabalho foram diluídas com solução salina 0,9% estéril.

### **3.4 Citocinas**

As citocinas recombinantes humanas utilizadas neste estudo foram provenientes do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) e gentilmente cedidas pelo Dr. Stephen Poole.

Foram utilizadas : IL-1 $\beta$  (lote 86/680), IL-4 (lote 88/656), IL-8 (lote 89/520), IL-13 (lote 94/622) e TNF $\alpha$  (lote 87/650). As atividades específicas destas citocinas são: IL-1 $\beta$ : 100,000 unidades internacionais (UI)/1  $\mu$ g/ampola), IL-4: 1,000 UI/0,1  $\mu$ g/ampola, IL-8: 1,000 UI/1  $\mu$ g/ampola, IL-13: 1,000 UI/1  $\mu$ g/ampola e TNF $\alpha$ : 40,000 UI/1  $\mu$ g/ampola.

### **3.5 Anticorpos monoclonais**

Os anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4: BVDG e 11B11 murinos foram produzidos administrando os hibridomas em camundongos nude previamente administrados com pristane. As ascites foram colhidas e os anticorpos purificados por precipitação com sulfato de amônio. Os hibridomas foram gentilmente cedidos pelo Professor F. Liew, University of Glasgow, Inglaterra. O anticorpo monoclonal (IgG) específico para IL-13 humana foi proveniente do NIBSC e gentilmente doado pelo Dr. Stephen Poole. Anticorpos monoclonais controles foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

### **3.6 Depleção de mastócitos em patas de ratos**

DI ROSA et al. (1971), descreveram a propriedade de desgranulação do composto 48/80 sobre os mastócitos. O composto 48/80 pode inserir-se na membrana plasmática e ativar diretamente uma proteína G, o que resulta na liberação de segundos mensageiros como o diacilglicerol e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>)

(MOUSLI et al., 1990 a, b). Esses mediadores induzem aumento da concentração intracelular de  $Ca^{+2}$ , que mobiliza e induz a liberação dos grânulos mastocitários.

Neste estudo, o composto 48/80 foi utilizado para caracterizar se essas células eram o tipo celular responsável pela liberação local de IL-4 ou IL-13. Dessa maneira, o composto 48/80 foi administrado diariamente pela via i.pl., em volume de 50  $\mu$ l, durante quatro dias, nas doses de 1  $\mu$ g/pata (primeiro dia), 3  $\mu$ g/pata (segundo dia) e 10  $\mu$ g/pata (terceiro e quartos dias). CUNHA et al. (1999), utilizando análises histopatológicas descreveram a eficácia do tratamento crônico com composto 48/80 em depletar os mastócitos em patas de ratos.

Avaliou-se então, nos animais tratados com 48/80 (depletados de mastócitos), o efeito do pré-tratamento feito com anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina.

### **3.7 Delineamento dos procedimentos experimentais.**

Em todos os experimentos, inicialmente, os animais foram submetidos ao teste de hiperalgesia mecânica para a avaliação da latência basal.

A IL-4, IL-13 ou os anticorpos monoclonais específicos para estas citocinas sempre foram administradas por via i.pl., num volume de 50  $\mu$ l, 30 min antes da injeção dos diferentes estímulos hiperalgésicos.

Os estímulos hiperalgésicos utilizados neste trabalho foram carragenina, bradicinina,  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e  $PGE_2$  e sempre foram administrados num volume de



100 µl, por via i.pl., nas mesmas patas já tratadas com as citocinas ou com seus respectivos anticorpos.

A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a indução da hiperalgesia em todos os protocolos experimentais. O intervalo de 3 h foi escolhido pelo fato de que, nesta metodologia, as doses dos estímulos utilizados induzem seus picos hiperalgésicos neste tempo (FERREIRA et al., 1988, 1993; CUNHA et al., 1991, 1992; POOLE, et al., 1995).

Os grupos controles receberam injeções de salina 0,9%, num volume de 50 µl, i.pl., 30 min antes da administração dos estímulos hiperalgésicos. Estes grupos foram avaliados em paralelo com seus grupos experimentais, no sentido de evitar possíveis influências externas sobre os resultados.

Os animais depletados com 48/80 receberam, no 5º dia, injeções dos anticorpos monoclonais específicos para a IL-4 e IL-13 ou dos anticorpos monoclonais controles. Trinta min depois, os mesmos animais foram injetados com bradicinina nas patas depletadas de mastócitos e previamente tratadas.

Nos experimentos com ratos atímicos, os anticorpos monoclonais específicos para a IL-4 e IL-13 ou os anticorpos monoclonais controles foram injetados 30 min antes da bradicinina.

Com o propósito de se evitar qualquer direcionamento do resultado por parte do experimentador, todos os experimentos foram realizados no sistema duplo-cego, ou seja, um experimentador preparou as soluções, um segundo injetou e um terceiro quantificou a intensidade de hiperalgesia.

### **3.8 Análise estatística dos resultados.**

Os resultados são apresentados como médias aritméticas de grupos de 5 animais acompanhadas de seus respectivos erros padrão da média (E.P.M.). A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste “t” de Student não pareado para comparações entre cada grupo experimental e seu respectivo controle e pelo teste de análise de variância (ANOVA) para comparações entre mais de dois grupos. Quando este último acusou diferenças com nível de significância  $P < 0,05$ , procedeu-se a realização do teste de Bonferroni. Os resultados com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

**RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

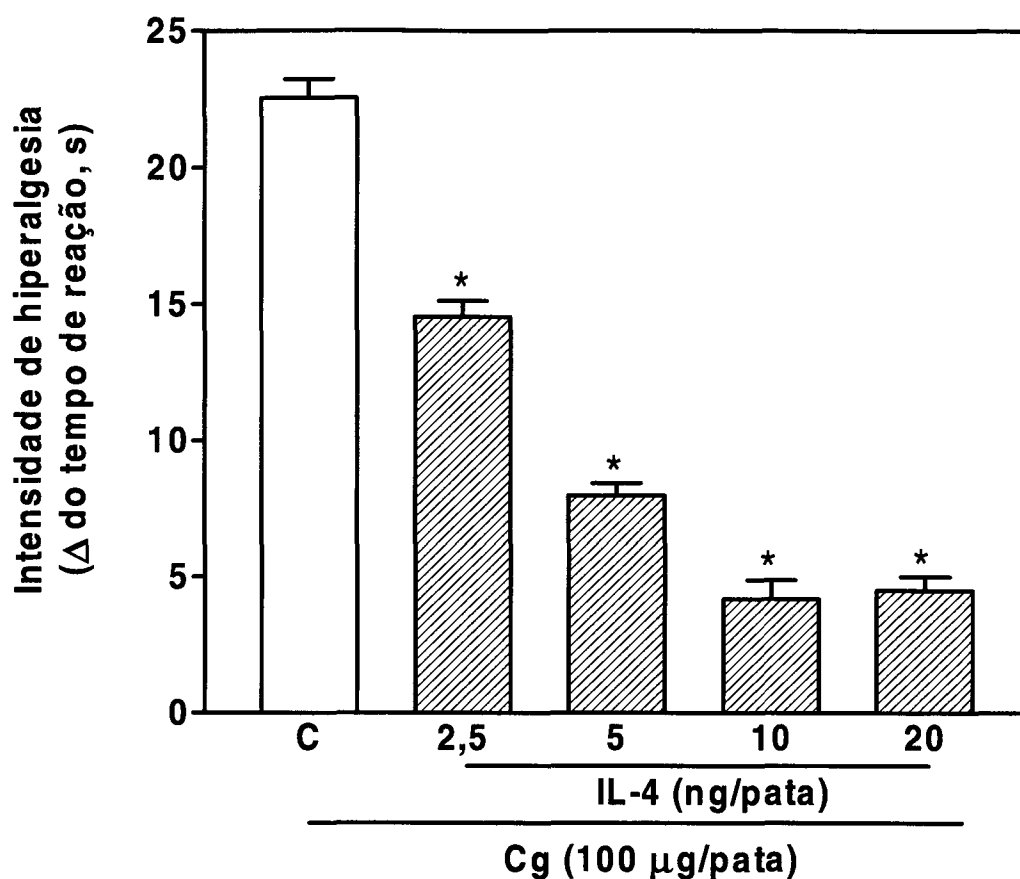
### 4.1 Efeito da IL-4 e IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ .

O pré-tratamento com IL-4 nas doses de 2,5; 5,0 e 10 ng inibiu de maneira dose dependente a hiperalgesia induzida por carragenina (36, 65 e 81%, respectivamente, Figura 4). Com a dose de 10 ng de IL-4 observou-se efeito inibitório máximo, pois a dose de 20 ng não foi mais eficiente do que a de 10 ng em inibir a hiperalgesia induzida por carragenina.

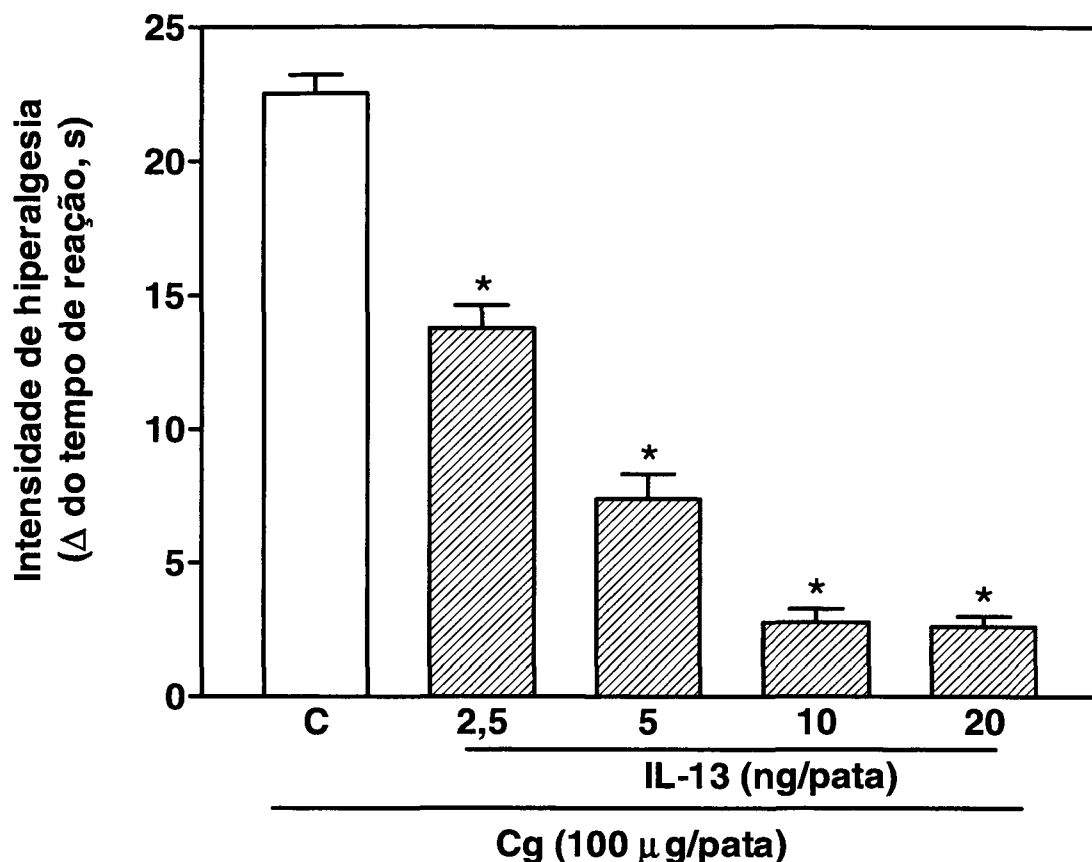
Quando os estímulos hiperalgésicos utilizados foram a bradicinina e o TNF $\alpha$ , o tratamento realizado com IL-4 (2,5; 5,0 e 10 ng) também inibiu os efeitos hiperalgésicos induzidos por estes estímulos de maneira dose-dependente (bradicinina: 33, 53 e 84%, respectivamente, Figura 6; TNF $\alpha$ : 6, 55 e 86%, respectivamente, Figura 8).

O pré-tratamento com IL-13 nas doses de 2,5; 5,0 e 10 ng inibiu de maneira dose dependente a hiperalgesia induzida por carragenina (39, 67 e 88%, respectivamente, Figura 5). Assim como observado para a IL-4, a dose de 10 ng de IL-13 teve efeito máximo sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

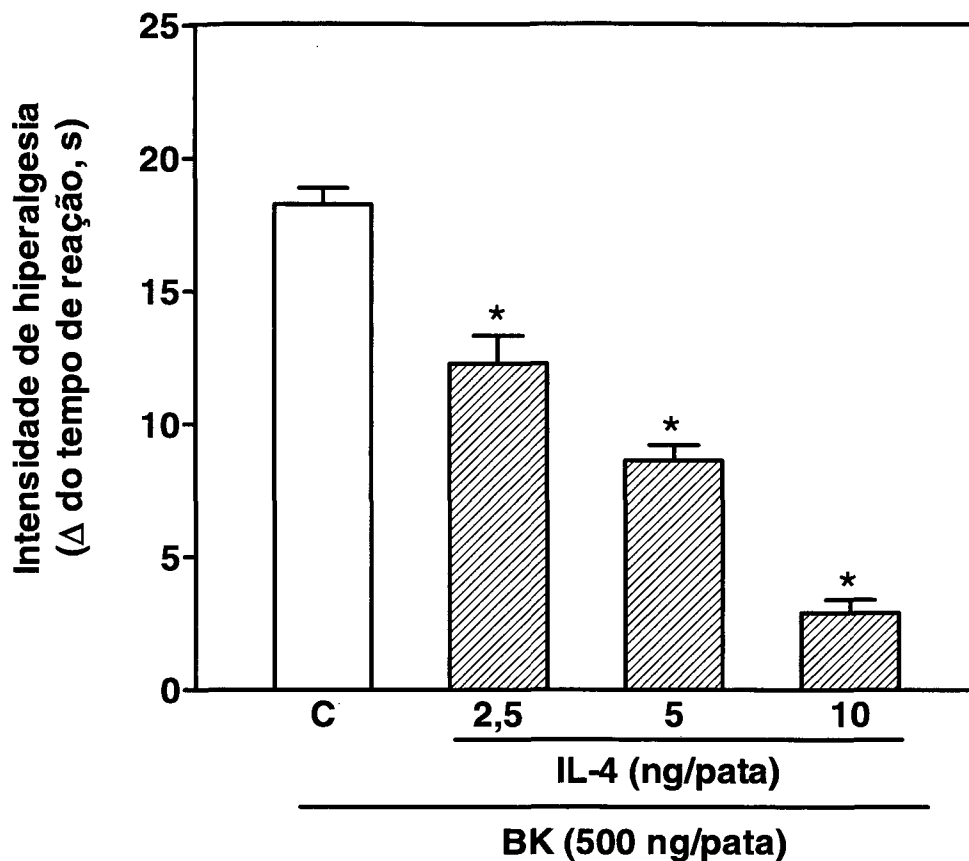
Quando a hiperalgesia foi induzida por bradicinina, as doses de 2,5; 5,0 e 10 ng de IL-13 inibiram esta hiperalgesia em 14, 55 e 79%, respectivamente (Figura 7). Estas mesmas doses de IL-13 inibiram a hiperalgesia induzida por TNF $\alpha$  em 17, 52 e 82%, respectivamente (Figura 9).



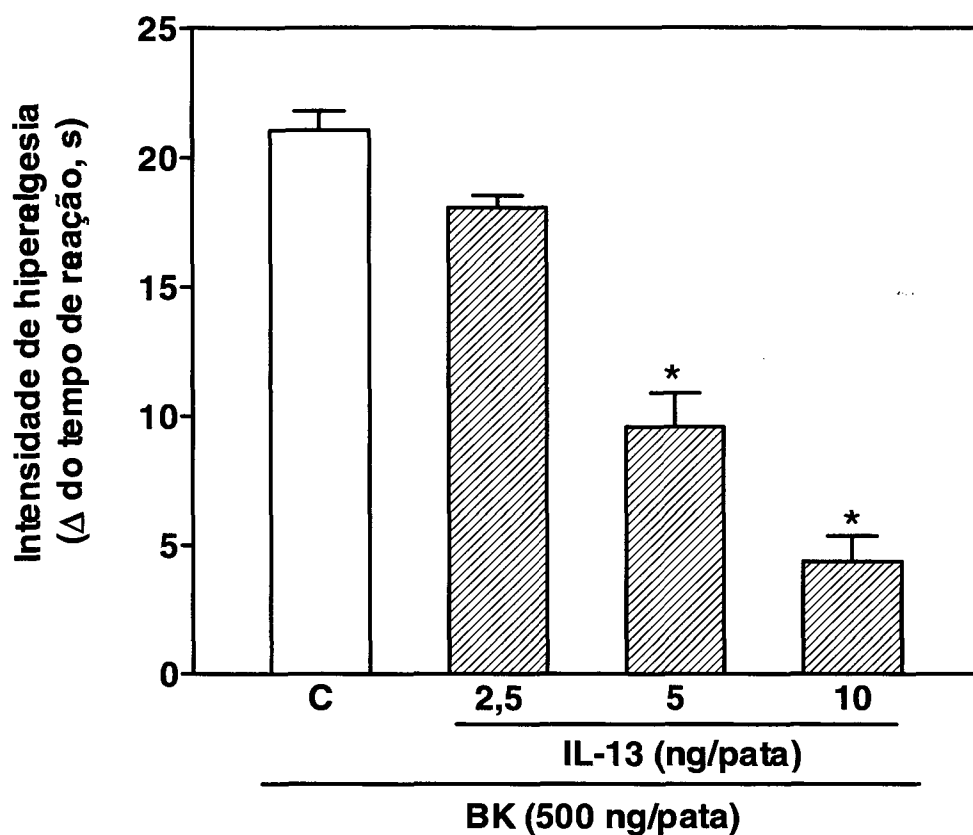
**Figura 4: Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg).** A IL-4 (2,5-20 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da injeção de carragenina (100  $\mu$ g/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da carragenina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



**Figura 5: Efeito da IL-13 sobre a hiperalgésia induzida por carragenina (Cg).** A IL-13 (2,5-20 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da injeção de carragenina (100  $\mu$ g/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgésia foi avaliada 3 h após a injeção da carragenina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

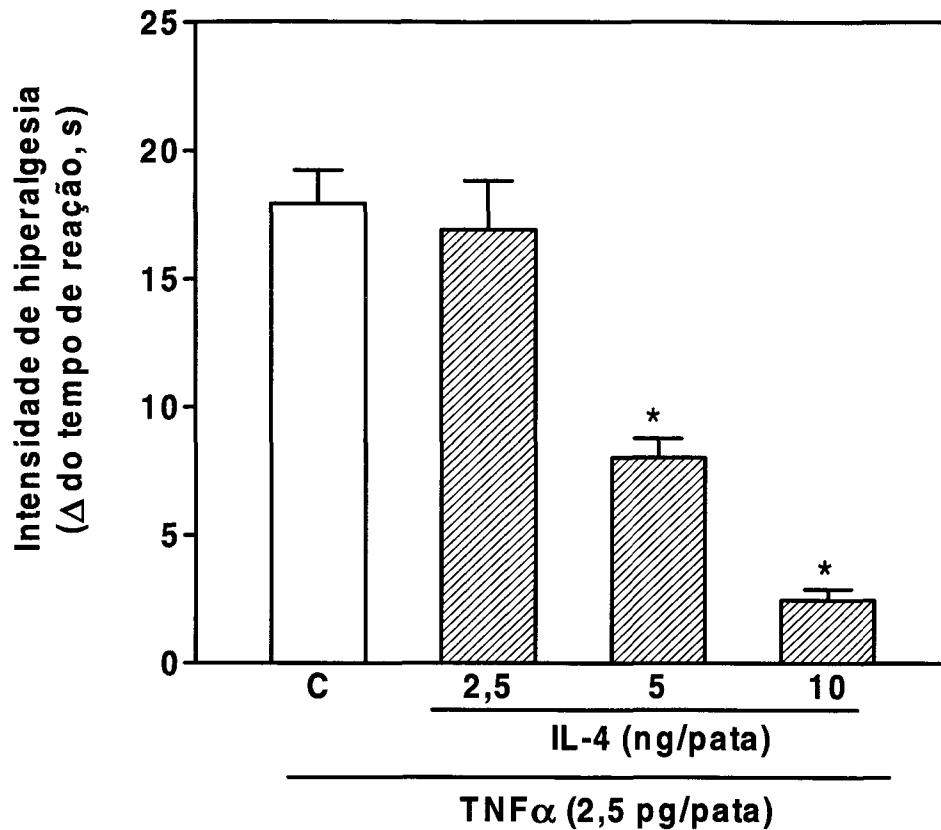


**Figura 6: Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina (BK).** A IL-4 (2,5-10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da bradicinina (500 ng/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da bradicinina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

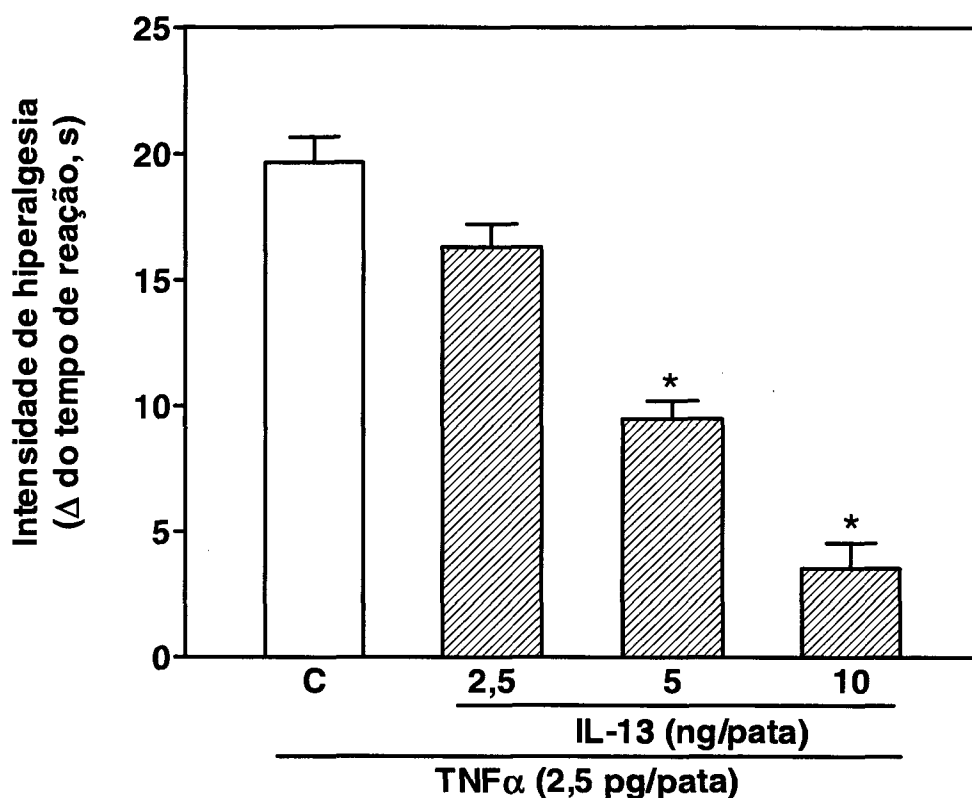


**Figura 7: Efeito da IL-13 sobre a hiperalgésia induzida por bradicinina (BK).** A IL-13 (2,5-10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da bradicinina (500 ng/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgésia foi avaliada 3 h após a injeção da bradicinina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).





**Figura 8: Efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).** A IL-4 (2,5-10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da injeção de TNF $\alpha$  (2,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do TNF $\alpha$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



**Figura 9: Efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).** A IL-13 (2,5-10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da injeção de TNF $\alpha$  (2,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do TNF $\alpha$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.2 Ausência de efeito da IL-4 e IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>.**

A IL-4 ou a IL-13 foram administradas na dose de 10 ng, i.pl. e 30 min depois, as mesmas patas receberam injeção de IL-1 $\beta$  (0.5 pg, Figuras 10 e 11, painéis A), IL-8 (100 pg, Figuras 10 e 11, painéis B) ou PGE<sub>2</sub> (100 ng, Figuras 10 e 11, painéis C). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após as injeções destes estímulos. Conforme mostram as Figuras 10 e 11, os tratamentos feitos com IL-4 ou IL-13 não afetaram a hiperalgesia provocada por estes estímulos.

#### **4.3 Efeito da IL-4 e IL-13 administradas em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ e IL-8.**

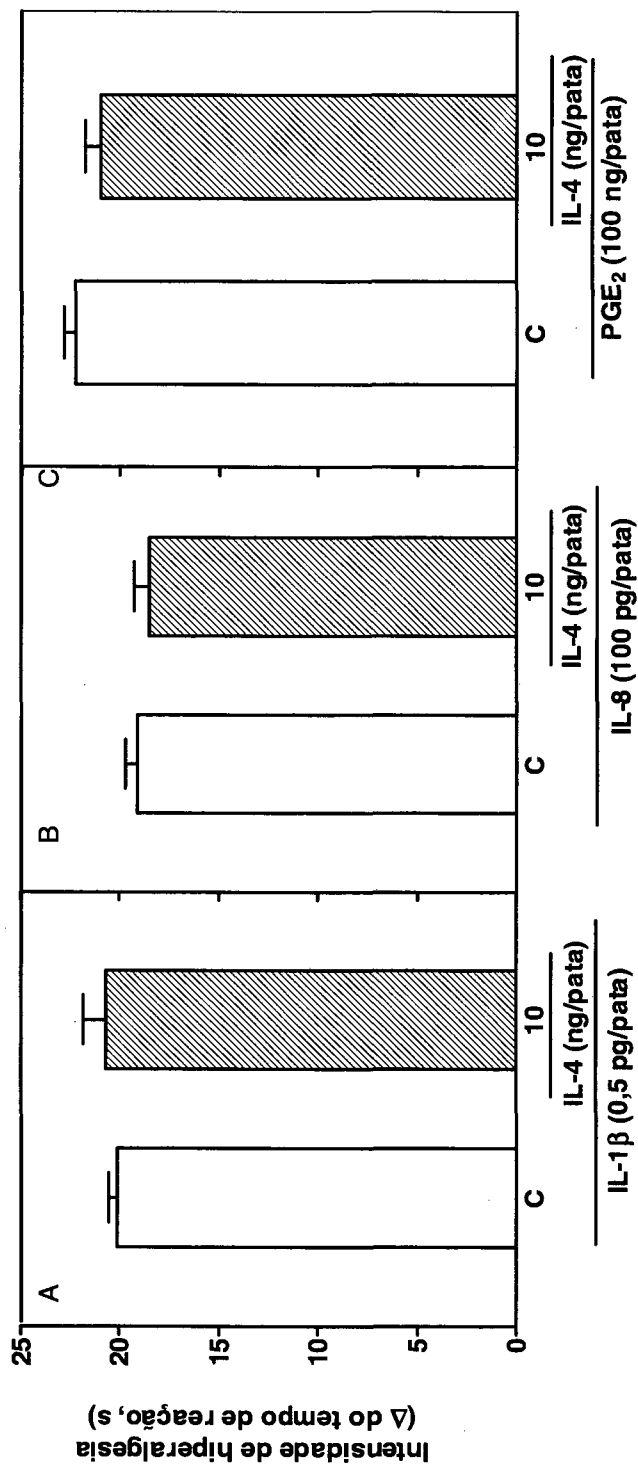
O tratamento com IL-4 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou IL-13 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) em uma das patas dos animais foi realizado com uma única injeção 2 ou 12 h ou com duas injeções 12 e 2 h antes da administração de IL-1 $\beta$  (0,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl.) ou IL-8 (100 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). No grupo controle (C) foi administrado solução salina 0,9% 2 h antes da injeção de IL-1 $\beta$  ou IL-8.

A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção dos estímulos.

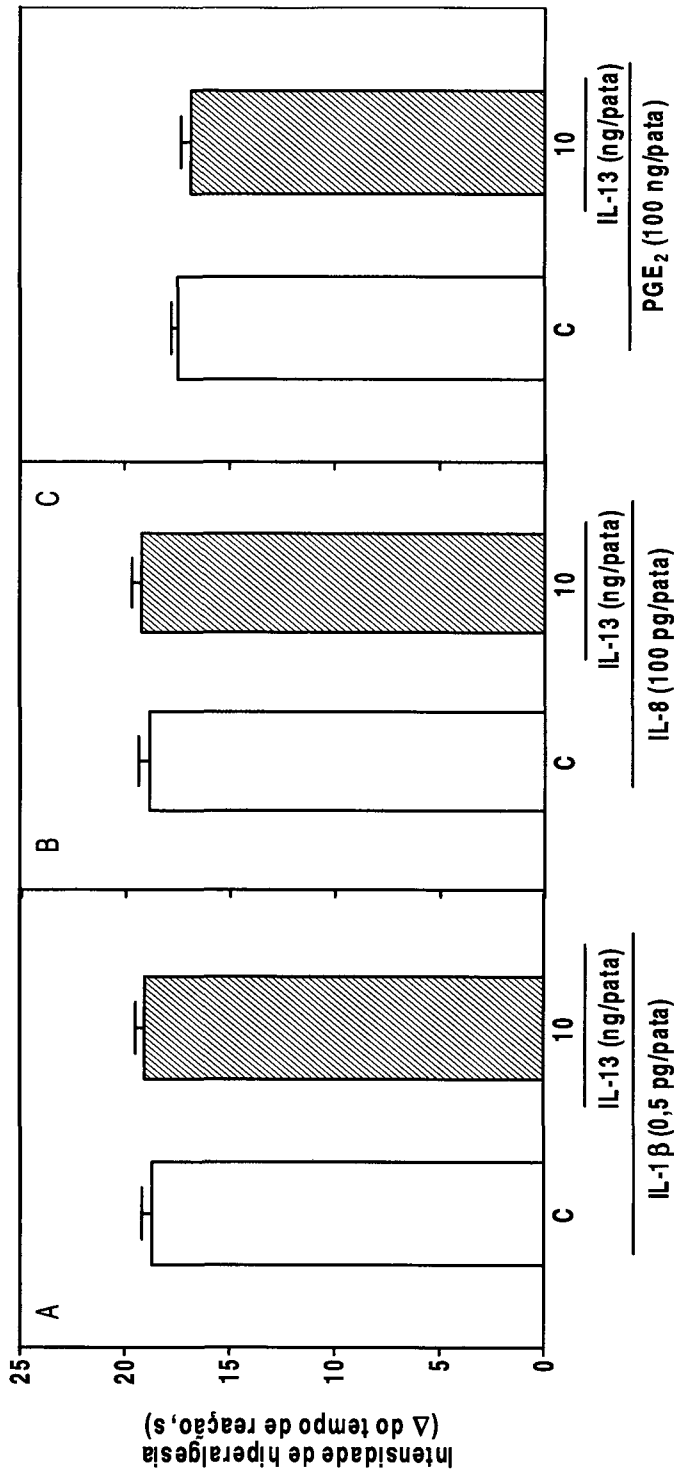
A IL-4 ou a IL-13 injetadas 2 h antes da administração de IL-1 $\beta$  não afetaram a resposta hiperalgésica induzida por esta citocina (Figuras 12 e 13). O tratamento realizado com IL-4 12 h antes da injeção da IL-1 $\beta$  inibiu a hiperalgesia em 30%. Esta inibição foi maior quando os animais receberam duas injeções i.pl. de 10 ng de IL-4 (74%, Figura 12). O tratamento realizado com uma única injeção de IL-13 12 ou

duas injeções 12 e 2 h antes da injeção da IL-1 $\beta$  inibiu a hiperalgesia em 35 e 77%, respectivamente (Figura 13).

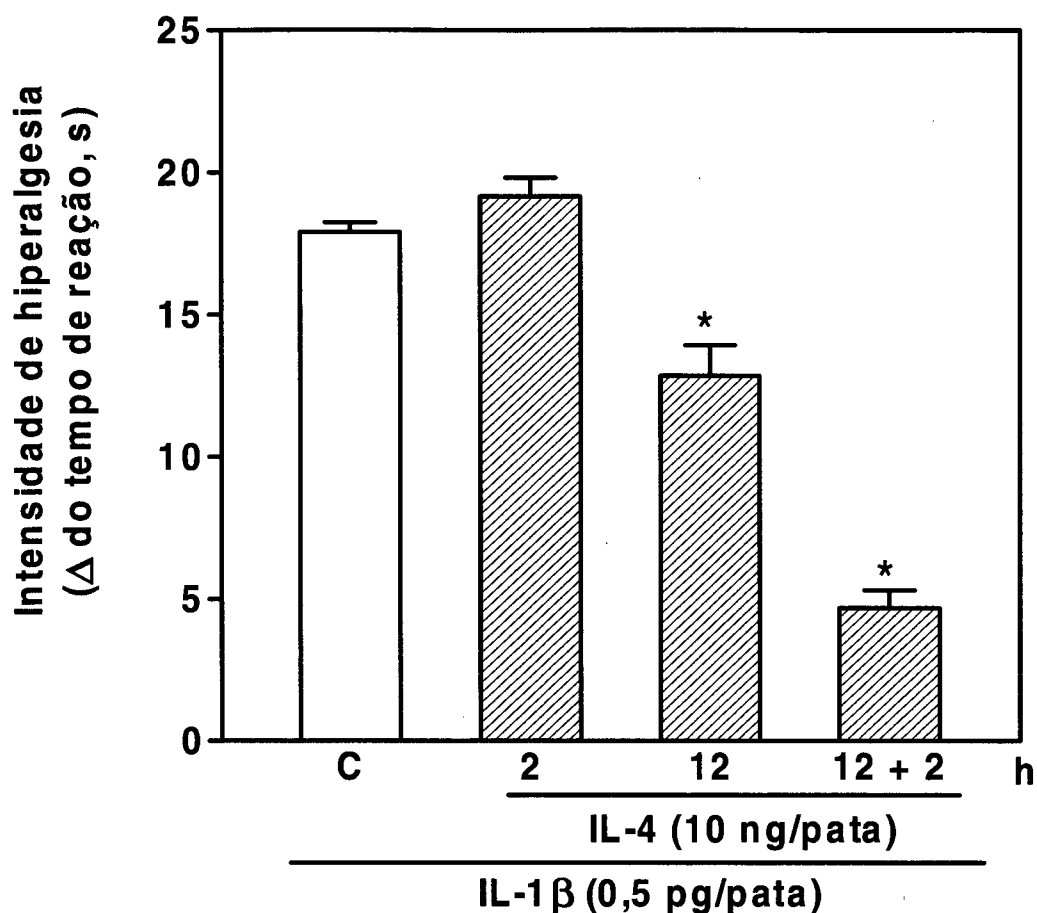
A hiperalgesia induzida pela IL-8 não foi afetada pelo tratamento com IL-4 ou com IL-13 administradas 2, 12 ou 12+2 h (Figuras 14 e 15).



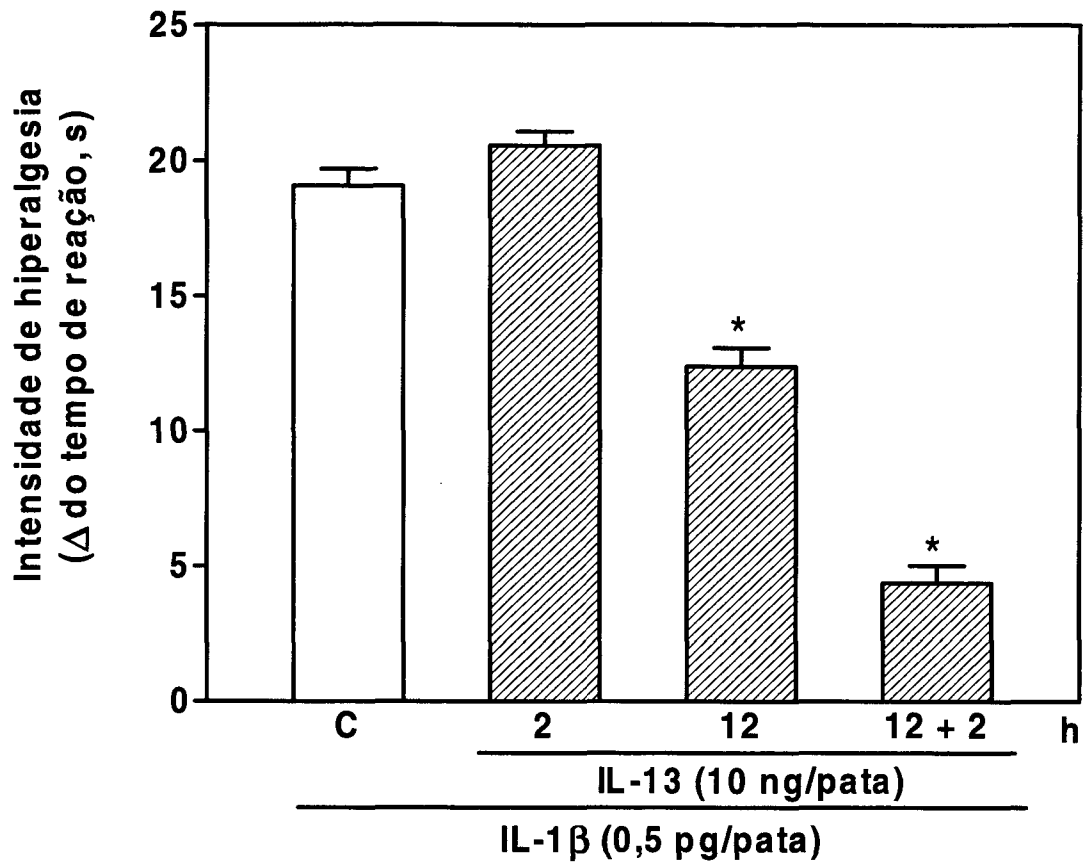
**Figura 10: Ausência de efeito da IL-4 sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>.** A IL-4 (10 ng/ 50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da administração de IL-1 $\beta$  (0,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl., painel A), IL-8 (100 pg/100  $\mu$ l, i.pl., painel B) ou PGE<sub>2</sub> (100 ng/100  $\mu$ l, i.pl., painel C). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção dos estímulos hiperalgeésicos. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. A IL-4 não alterou o delta do tempo de reação dos animais tratados com IL-1 $\beta$ , IL-8 ou PGE<sub>2</sub> (P > 0,05; teste "t" de Student não pareado).



**Figura 11: Ausência de efeito da IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>.** A IL-13 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 30 min antes da administração de IL-1 $\beta$  (0,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl., painel A), IL-8 (100 pg/100  $\mu$ l, i.pl., painel B) ou PGE<sub>2</sub> (100 ng/100  $\mu$ l, i.pl., painel C). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção dos estímulos hiperalgeicos. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. A IL-13 não alterou o delta do tempo de reação dos animais tratados com IL-1 $\beta$ , IL-8 ou PGE<sub>2</sub> ( $P > 0,05$ ; teste "t" de Student não pareado).

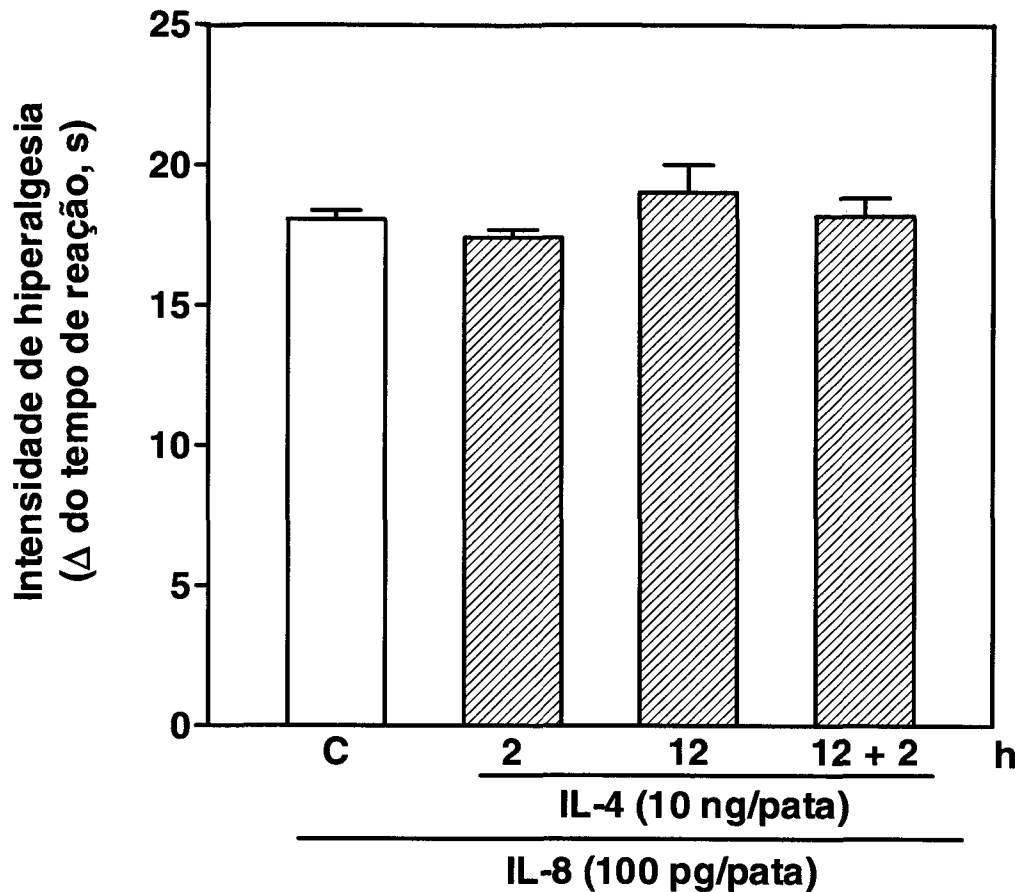


**Figura 12: Efeito da IL-4 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ .** A IL-4 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 2, 12 ou 12 + 2 h antes da injeção da IL-1 $\beta$  (0,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-1 $\beta$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

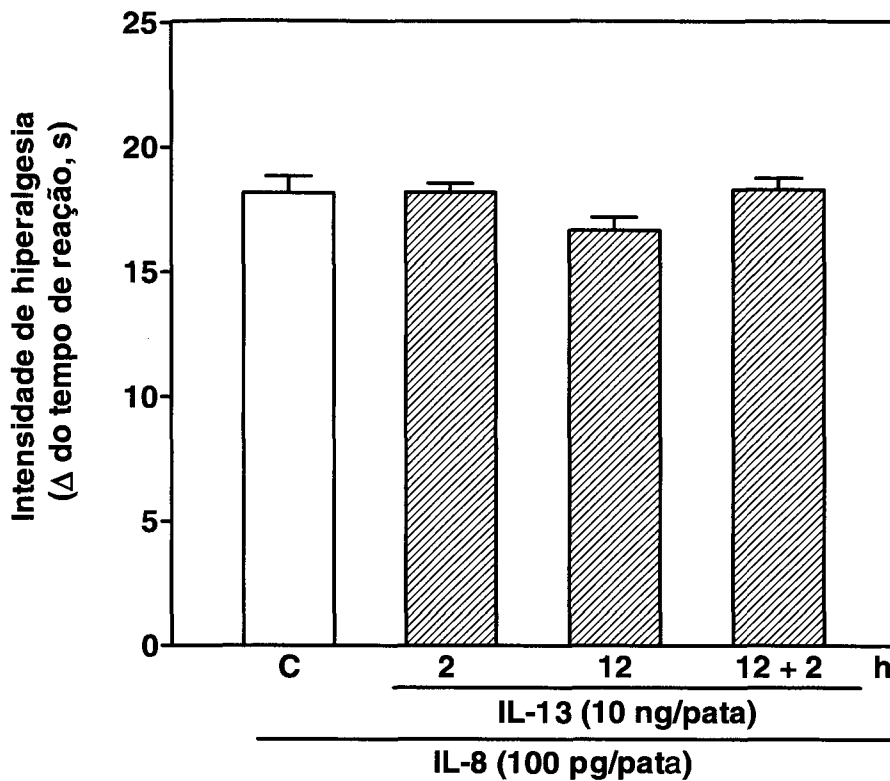


**Figura 13: Efeito da IL-13 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ .** A IL-13 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 2, 12 ou 12 + 2 h antes da injeção da IL-1 $\beta$  (0,5 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-1 $\beta$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).





**Figura 14: Efeito da IL-4 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-8.** A IL-4 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 2, 12 ou 12 + 2 h antes da injeção da IL-8 (100 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-8. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. A IL-4 não alterou o delta do tempo de reação dos animais tratados com IL-8 em nenhum dos tempos ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

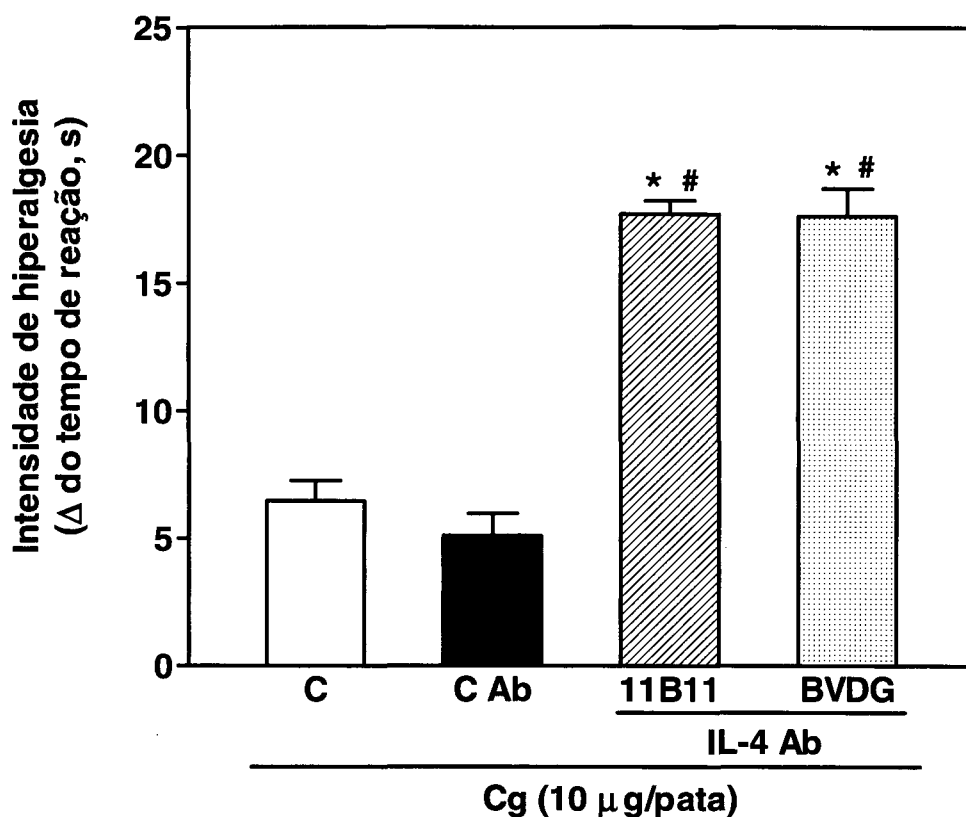


**Figura 15: Efeito da IL-13 administrada em diferentes tempos sobre a hiperalgesia induzida por IL-8.** A IL-13 (10 ng/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0.9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetadas na pata posterior direita dos animais, 2, 12 ou 12 + 2 h antes da injeção da IL-8 (100 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-8. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. A IL-13 não alterou o delta do tempo de reação dos animais tratados com IL-8 em nenhum dos tempos ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

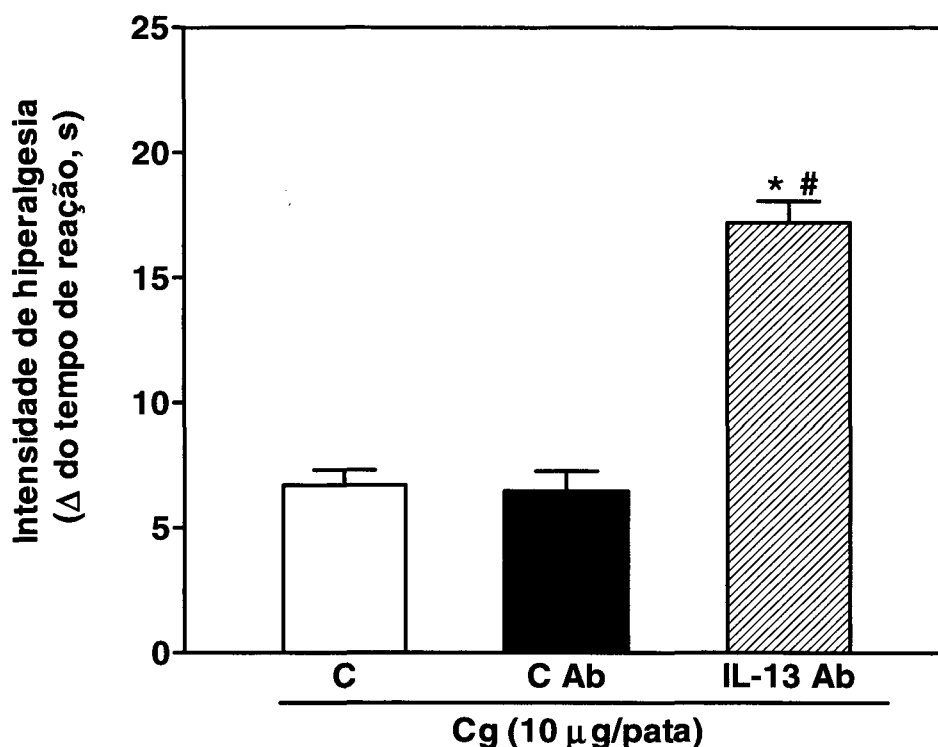
#### **4.4 Potencialização pelos anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4 ou para IL-13 das respostas hiperalgésicas induzidas por carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ , mas não por IL-1 $\beta$ e IL-8.**

Os anticorpos monoclonais para a IL-4 murina, 11B11 (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata) e BVDG (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata), e o anticorpo monoclonal controle C Ab (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata), foram injetados 30 min antes da administração i.pl. de carragenina (10  $\mu$ g/100  $\mu$ l/pata, Figura 16), bradicinina (50 ng/100  $\mu$ l/pata, Figura 18) e TNF $\alpha$  (0.25 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 20). O tratamento com o anticorpo monoclonal para a IL-4 potencializou as respostas hiperalgésicas medidas 3 h após a injeção destes estímulos. O anticorpo monoclonal 11B11 potencializou as respostas da carragenina em 347%, bradicinina em 269% e TNF $\alpha$  em 380%. O anticorpo monoclonal BVDG potencializou a hiperalgesia induzida pela carragenina em 345%, bradicinina em 279% e TNF $\alpha$  em 328%. Os efeitos hiperalgésicos induzidos por IL-1 $\beta$  (0,05 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 22) ou IL-8 (10 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 24) não foram afetados pelos pré-tratamentos com o anticorpo monoclonal 11B11 (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata) ou anticorpo controle C Ab (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata).

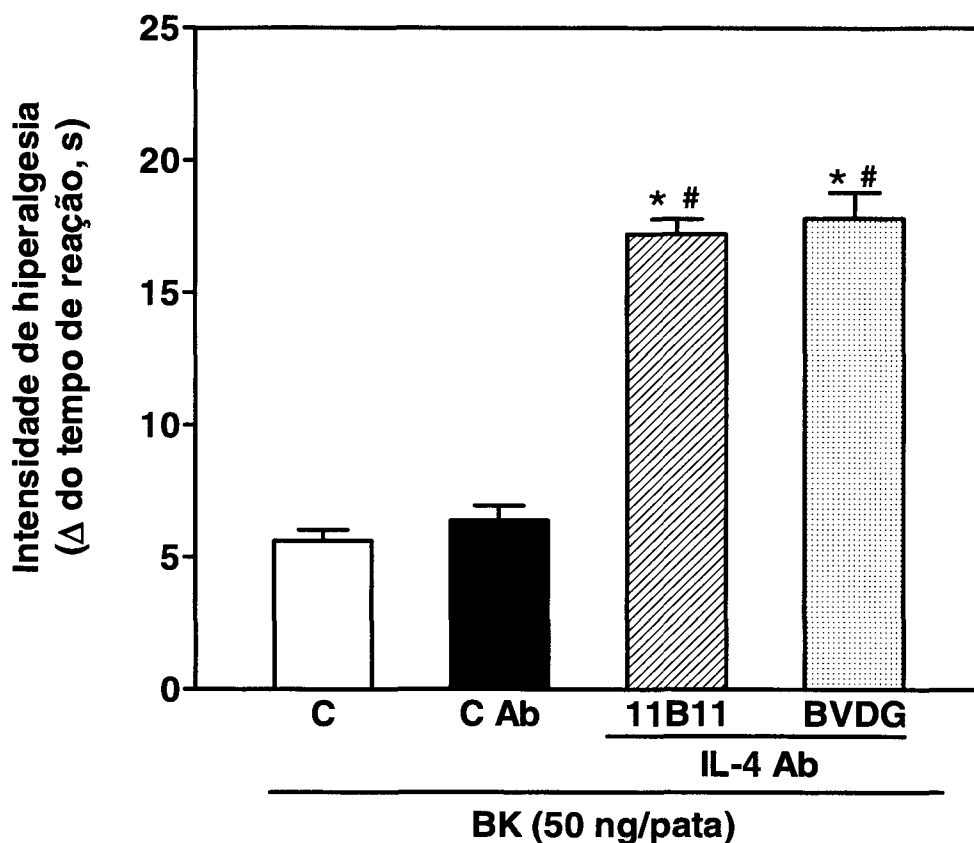
Em comparação com o anticorpo controle, o anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab, 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l/pata) injetado 30 min antes da carragenina (10  $\mu$ g/100  $\mu$ l/pata, Figura 17), bradicinina (50 ng/100  $\mu$ l/pata, Figura 19) e TNF $\alpha$  (0.25 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 21) potencializou as respostas induzidas por estes estímulos em 265, 212 e 214%, respectivamente. Os efeitos hiperalgésicos induzidos por IL-1 $\beta$  (0,05 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 23) ou IL-8 (10 pg/100  $\mu$ l/pata, Figura 25) não foram afetados pelo pré-tratamento com o anticorpo monoclonal IL-13 Ab.



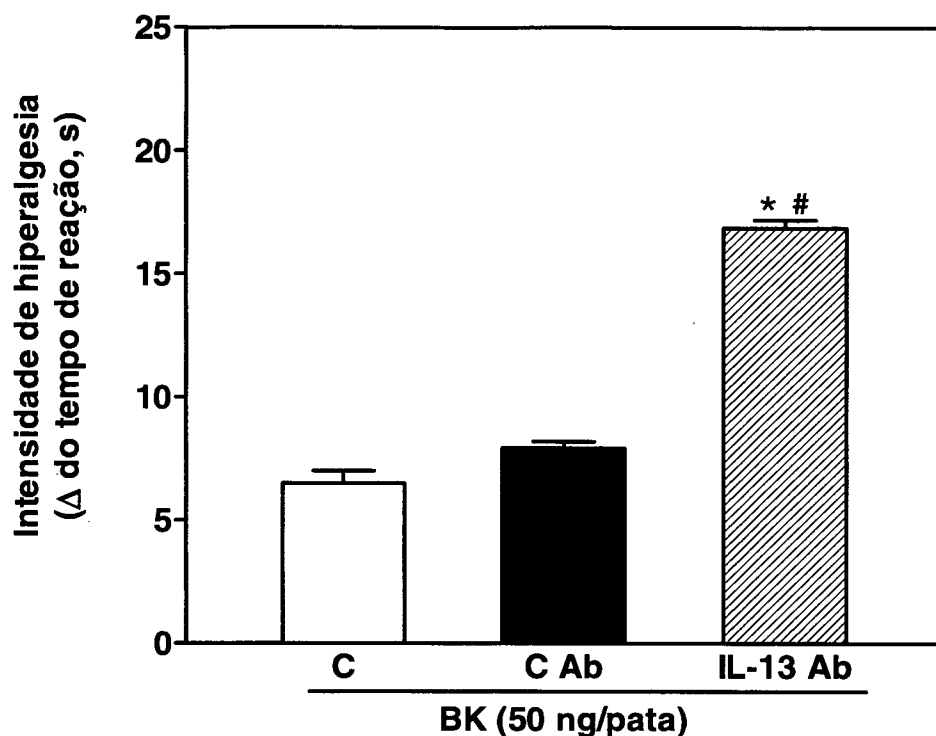
**Figura 16: Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 (IL-4 Ab), 11B11 e BVDG sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de carragenina (Cg).** Os anticorpos monoclonais para IL-4 (50 μg/50 μl, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50 μg/50 μl, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50 μl, i.pl.) foram injetados 30 min antes da administração de carragenina (10 μg/100 μl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da carragenina. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



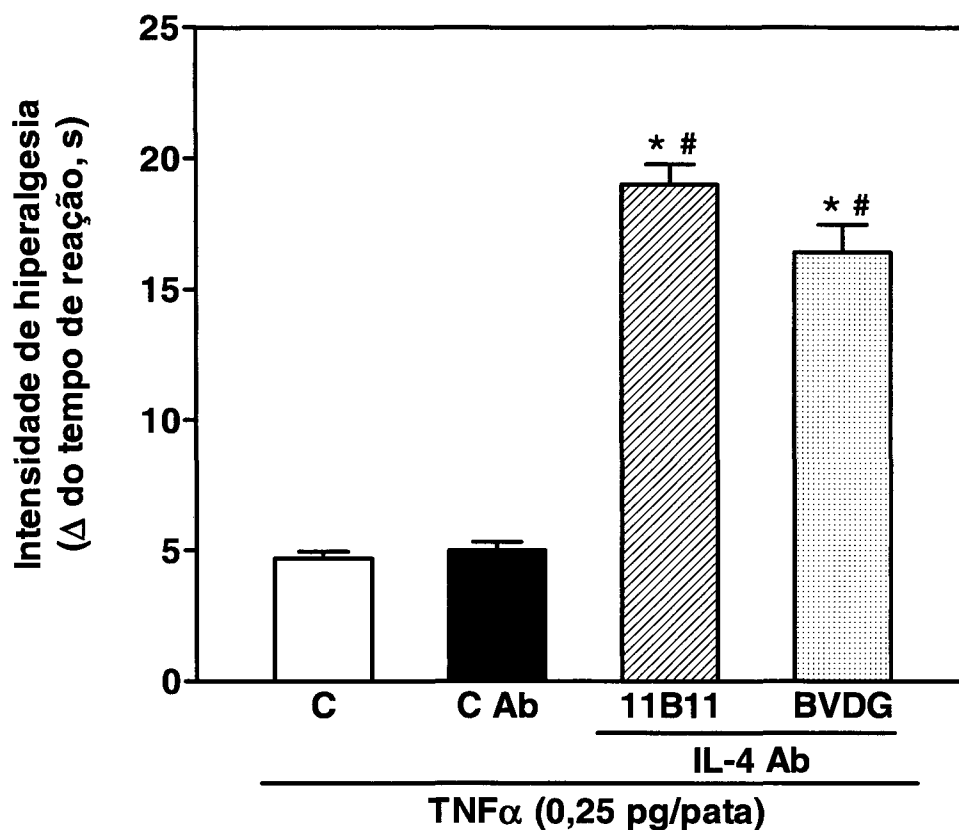
**Figura 17** Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab) sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de carragenina (Cg). O anticorpo monoclonal para IL-13 (50 μg/50 μl, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50 μg/50 μl, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50 μl, i.pl.) foram injetados 30 min antes da administração de carragenina (10 μg/100 μl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da carragenina. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab), respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



**Figura 18: Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 (IL-4 Ab), 11B11 e BVDG sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de bradicinina (BK).** Os anticorpos monoclonais para IL-4 (50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ , i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ , i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50  $\mu\text{l}$ , i.pl.) foram injetados 30 min antes da administração de bradicinina (50 ng/100  $\mu\text{l}$ , i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da bradicinina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

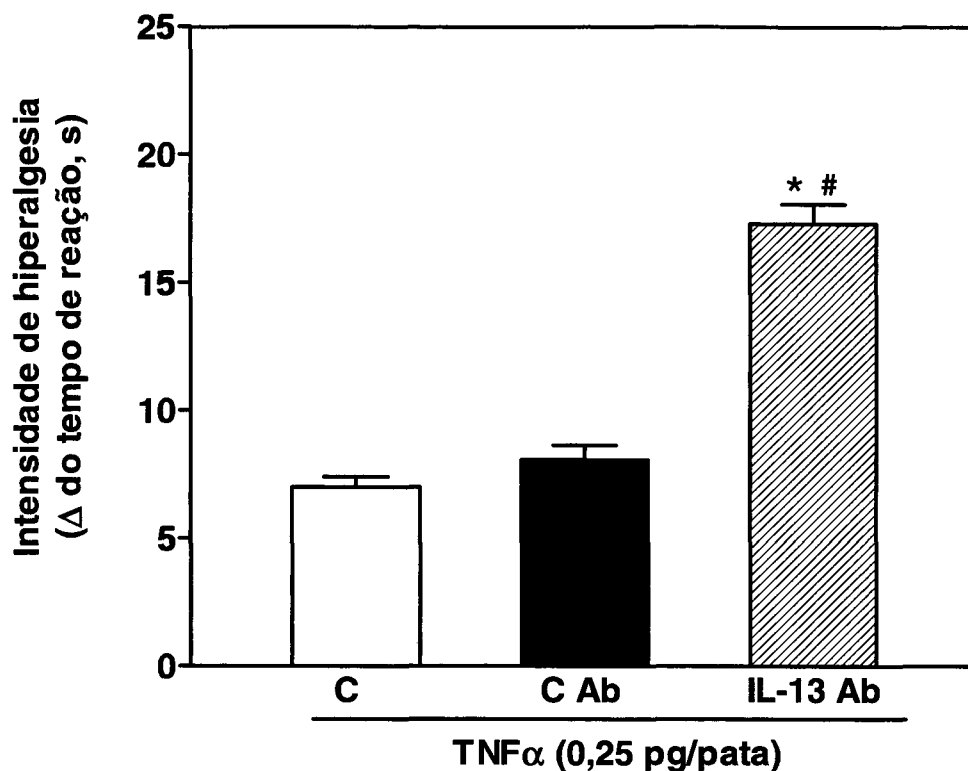


**Figura 19: Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab), sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de bradicinina (BK).** O anticorpo monoclonal para IL-13 (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetados 30 min antes da administração de bradicinina (50 ng/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da bradicinina. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

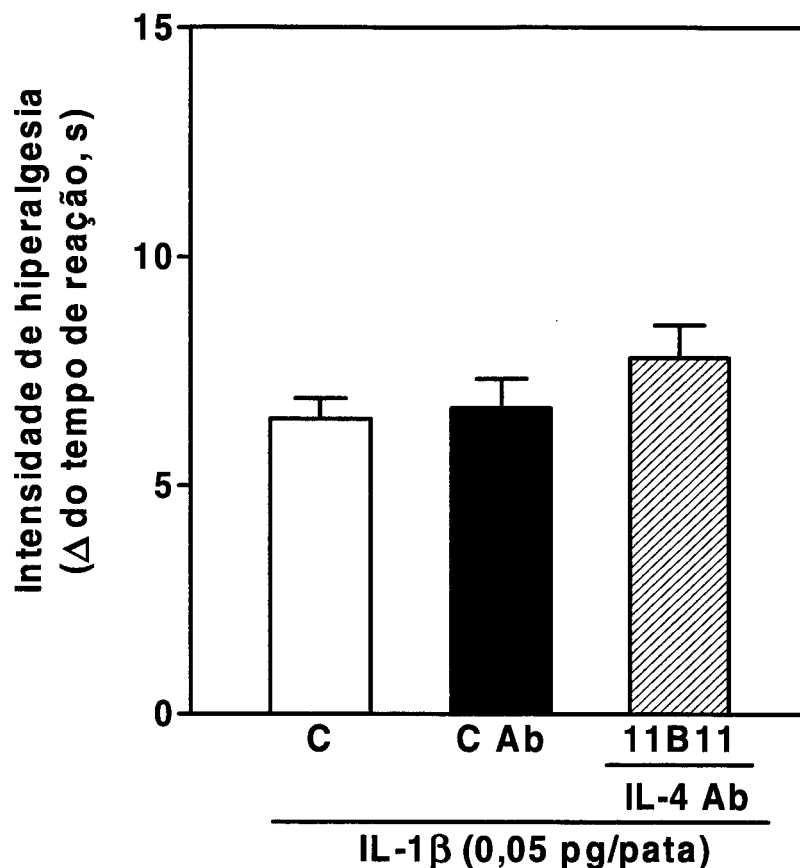


**Figura 20: Efeito de anticorpos monoclonais para IL-4 (IL-4 Ab), 11B11 e BVDG sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose TNF $\alpha$ .** Os anticorpos monoclonais (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção de TNF $\alpha$  (0,25 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do TNF $\alpha$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

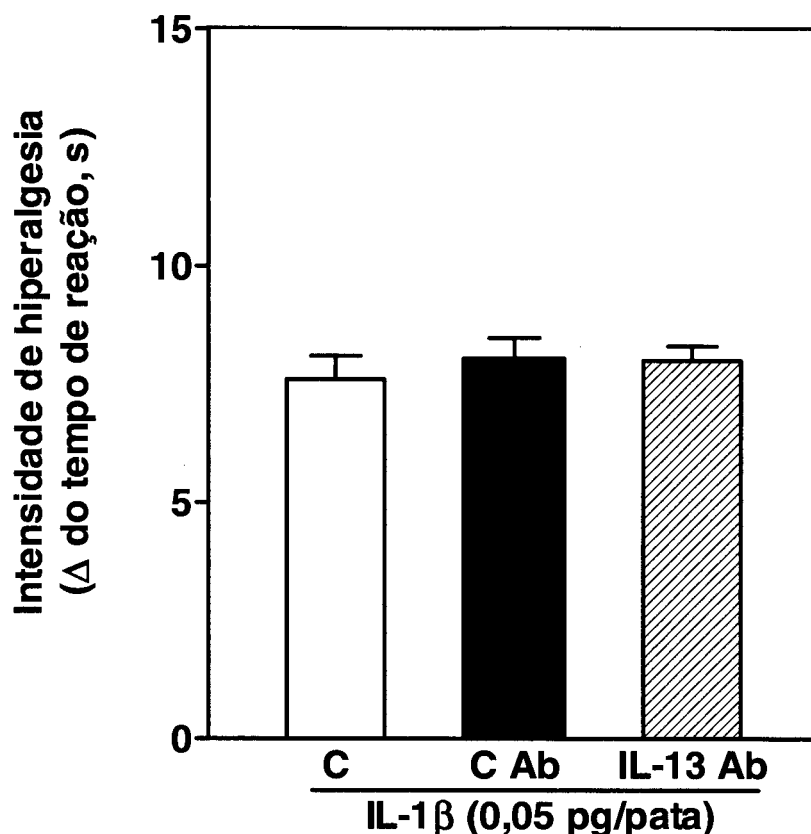




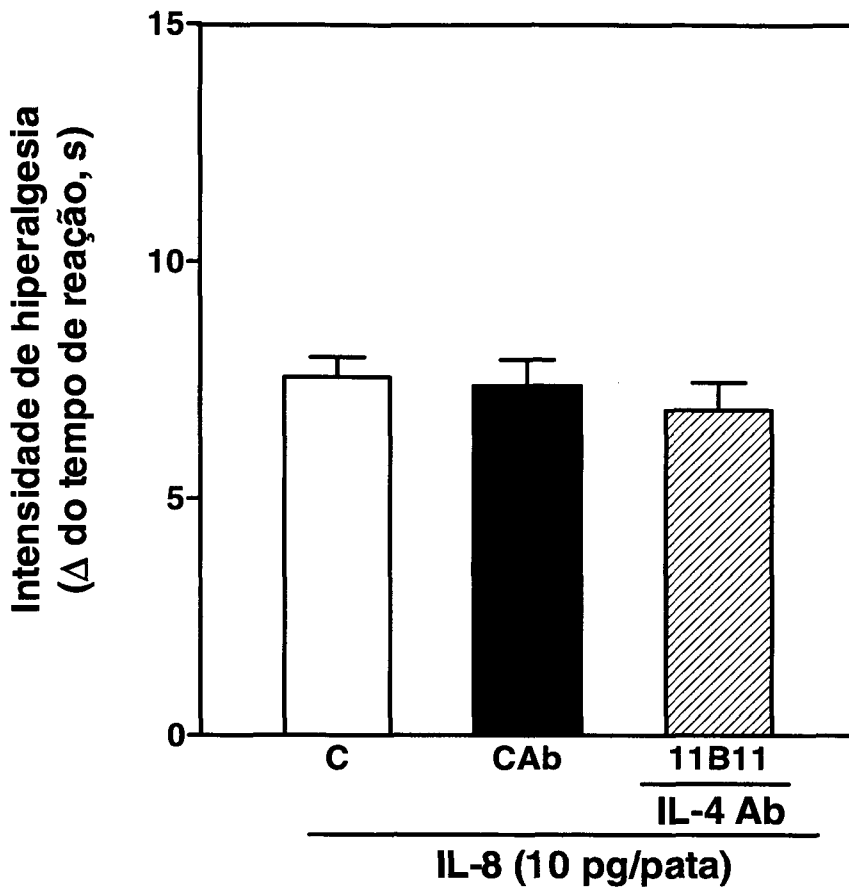
**Figura 21: Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab), sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose TNF $\alpha$ .** O anticorpo monoclonal para a IL-13 (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção de TNF $\alpha$  (0,25 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do TNF $\alpha$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) e cerquilhas (#) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (C) ou com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



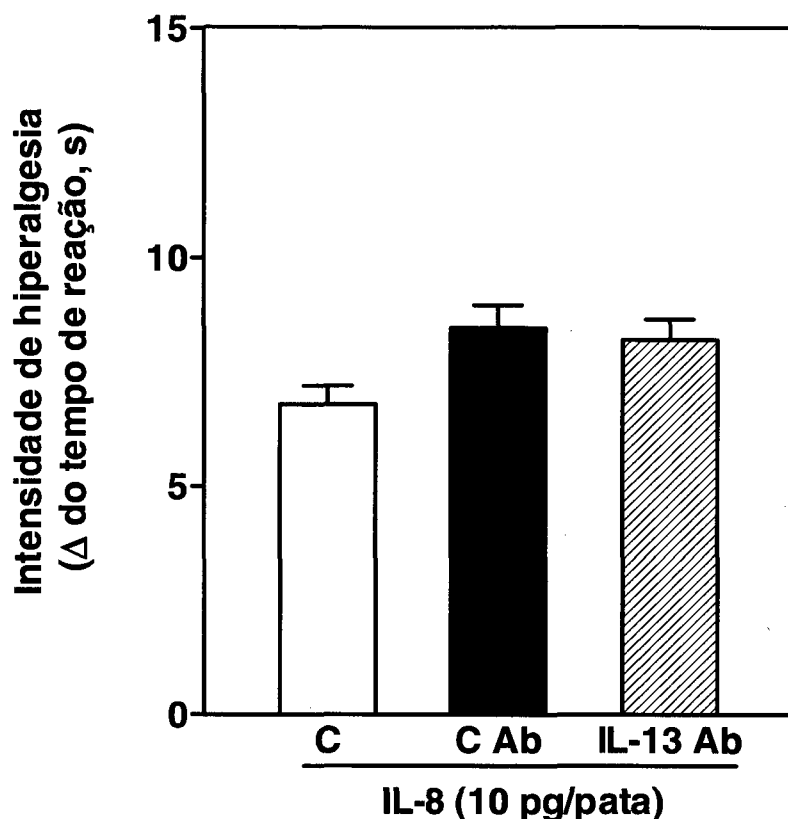
**Figura 22: Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 (IL-4 Ab), 11B11 sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de IL-1 $\beta$ .** O anticorpo monoclonal 11B11(50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50  $\mu$ l, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção da IL-1 $\beta$  (0,05 pg/100  $\mu$ l, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-1 $\beta$ . Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. O pré-tratamento dos animais com 11B11 não alterou os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-1 $\beta$  ( $P > 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 23: Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab), sobre a hiperalgésia induzida por uma pequena dose de IL-1β.** O anticorpo monoclonal para a IL13 (50 μg/50 μl, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50 μg/50 μl, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50 μl, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção da IL-1β (0,05 pg/100 μl, i.pl.). A intensidade de hiperalgésia foi avaliada 3 h após a injeção da IL-1β. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. O pré-tratamento dos animais com o AbIL-13 não alterou os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-1β ( $P > 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 24: Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 (IL-4 Ab), 11B11 sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de IL-8.** O anticorpo monoclonal 11B11 (50 µg/50 µl, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50 µl, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50 µl, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção de IL-8 (10 pg/100 µl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do estímulo hiperalgésico. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. O pré-tratamento dos animais com 11B11 não alterou os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-8 ( $P > 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 25: Ausência de efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab), sobre a hiperalgesia induzida por uma pequena dose de IL-8.** O anticorpo monoclonal para a IL-13 (50 µg/50 µl, i.pl.), anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50 µl, i.pl.) ou solução salina fisiológica 0,9% (C, 50 µl, i.pl.) foram injetados 30 min antes da injeção de IL-8 (10 pg/100 µl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do estímulo hiperalgésico. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. O pré-tratamento dos animais com AbIL-13 não alterou os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-8 ( $P > 0,05$ ; ANOVA).

#### **4.5. Potencialização pelo anticorpo monoclonal para IL-4 da hiperalgesia induzida por bradicinina em ratos atímicos (Nude Rowett).**

Em ratos atímicos, o anticorpo monoclonal para IL-4, BVDG (50 µg/50 µl/pata), e o anticorpo controle C Ab (50 µg/50 µl/pata) foram injetados 30 min antes da administração de bradicinina (50 ng/100 µl, i.pl.). O BVDG potencializou em 101% a intensidade de hiperalgesia medida 3 h após a injeção de bradicinina (Figura 26 A).

#### **4.6. Ausência de potencialização pelo anticorpo monoclonal para IL-4 do efeito hiperalgésico induzido pela bradicinina em patas de ratos depletadas de mastócitos.**

Em animais cujas patas foram depletadas de mastócitos pelo tratamento local (i.pl.) com o composto 48/80 foi injetado BVGD (50 µg/50 µl/pata) e 30 min após as mesmas patas foram injetadas com bradicinina (50 ng/100 µl).

Nestes animais não se observou a potencialização da resposta hiperalgésica induzida pela bradicinina, enquanto em animais controle (não depletados) houve um aumento de resposta na ordem de 104% (figura 26 B). A intensidade de hiperalgesia foi medida 3 h após a injeção de bradicinina.

#### **4.7 Detecção da resposta hiperalgésica à dextrana através do anticorpo monoclonal para IL-4.**

A injeção de dextrana (200 µg/100 µl/pata) na pata posterior direita de ratos Wistar não causa hiperalgesia. O anticorpo monoclonal para IL-4, BVDG (50 µg/50 µl/pata), mas não o anticorpo controle C Ab (50 µg/50 µl/pata), injetado 30 min antes

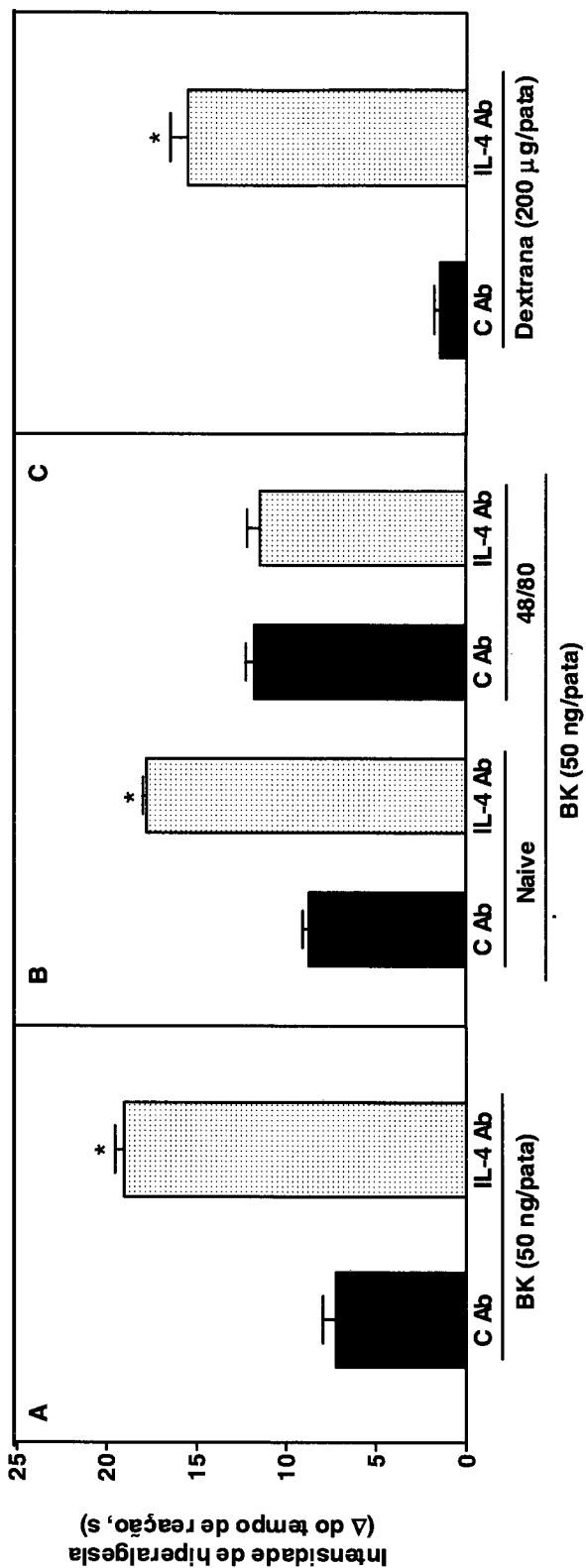
da dextrana tornou as patas sensíveis à esta, e possibilitou a detecção de uma resposta hiperalgésica, medida 3 h após a injeção da dextrana (Figura 26 C).

#### **4.8 Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 sobre as respostas hiperalgésicas induzidas por bradicinina em ratos atímicos.**

Diferentemente do efeito observado em ratos Wistar (Figura 19), a injeção do anticorpo monoclonal para IL-13 (50 µg/50 µl, i.pl.) em ratos Nude-Rowett, 30 min antes da injeção de bradicinina (50 ng/100 µl/pata) não potencializou a resposta hiperalgésica causada pela bradicinina (Figura 27A).

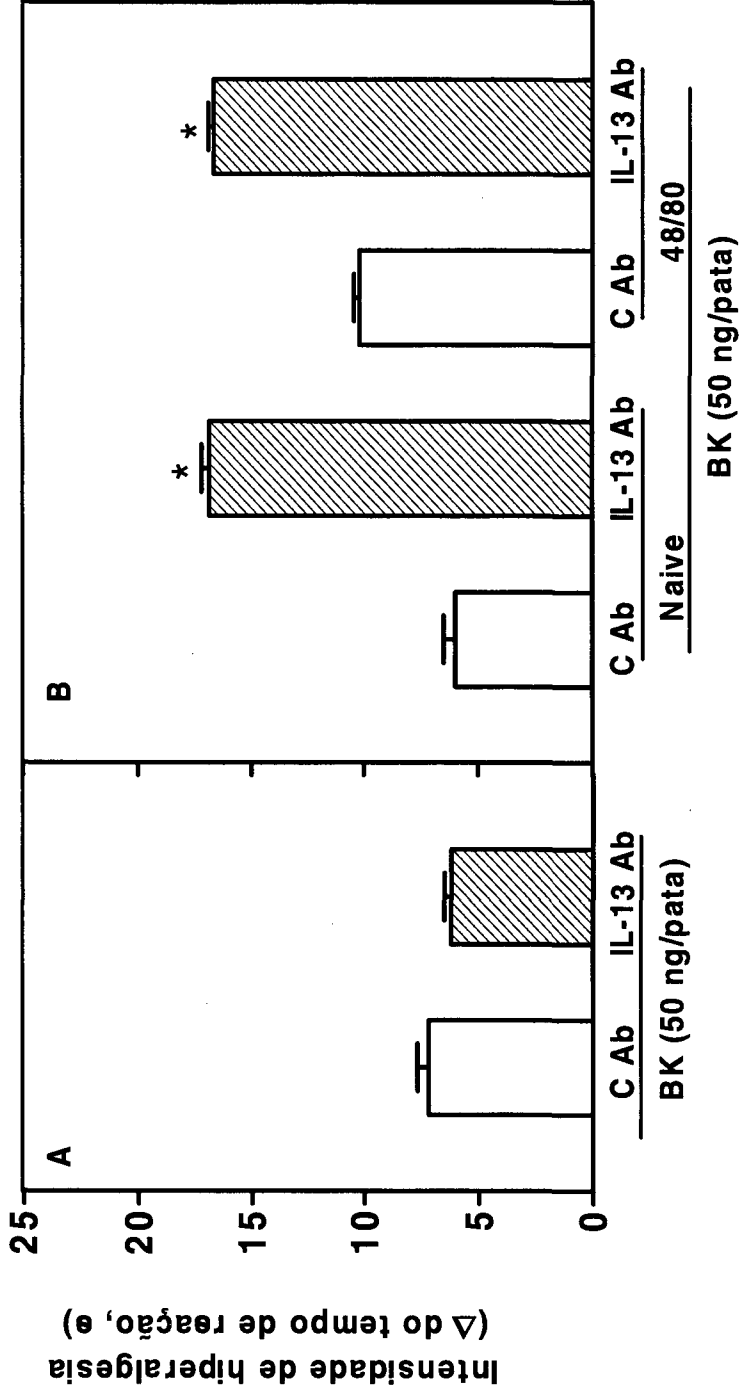
#### **4.9 Efeito da depleção de mastócitos em patas de ratos Wistar sobre a potencialização da hiperalgesia induzida pela bradicinina através do anticorpo monoclonal para IL-13.**

A depleção de mastócitos em patas tratadas com o composto 48/80 não afetou o efeito potencializador do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab, 50 µg/50 µl, i.pl.) sobre a hiperalgesia induzida pela bradicinina (50 ng/100 µl/pata, Figura 27B).



**Figura 26: Efeito do anticorpo monoclonal para IL-4 (IL-4 Ab), BVDG sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina (BK) e dextrana.** **Painel A:** Ratos atímicos (Nude) receberam injeções do anticorpo monoclonal para IL-4 (BVDG, 50 µg/50µl, i.pl.) ou anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) 30 min antes de uma pequena dose de bradicinina (50 ng/100µl, i.pl.). **Painel B:** Ratos naive ou depletados de mastócitos pelo tratamento crônico com 48/80 receberam injeções do anticorpo monoclonal para IL-4 (BVDG, 50 µg/50µl, i.pl.) ou anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) 30 min antes da injeção de uma pequena dose de bradicinina (50 ng/100µl, i.pl.). **Painel C:** Ratos naive receberam injeções do anticorpo monoclonal para IL-4 (BVDG, 50 µg/50µl, i.pl.) ou anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) 30 min antes da administração de dextrana (200 µg/100 µl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção dos estímulos hiperalgeicos. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).





**Figura 27: Efeito do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab), sobre a hiperalgesia induzida por bradicinina (BK).**  
**Painel A:** Ratos atímicos (Nude) receberam injeções do anticorpo monoclonal para IL-13 (50 µg/50µl, i.pl.) ou anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) 30 min antes de uma pequena dose de bradicinina (50 ng/100µl, i.pl.). **Painel B:** Ratos naive ou depletados de mastócitos pelo tratamento crônico com 48/80 receberam injeções do anticorpo monoclonal para IL-13 (IL-13 Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) ou anticorpo controle (C Ab, 50 µg/50µl, i.pl.) 30 min antes de uma pequena dose de bradicinina (50 ng/100µl, i.pl.). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção da bradicinina. Cada valor representa a média ± E.P.M. do delta do tempo de reação de 5 animais por grupo. Asteriscos (\*) indicam diferença com  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo anticorpo controle (C Ab) (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

**DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

A dor inflamatória é decorrente da produção e liberação aumentadas de mediadores químicos a partir de tecidos lesados. Estes mediadores estimulam receptores específicos nos neurônios sensoriais nociceptivos, levando à ativação ou sensibilização destas fibras (BACCAGLINI e HOGAN, 1983).

As pesquisas envolvendo a detecção de substâncias responsáveis pela sensibilização das fibras nociceptivas têm demonstrado um número de mediadores endógenos pró-inflamatórios cada vez maior. Dentre estas substâncias encontramos ininas, várias citocinas, aminas simpatomiméticas, eicosanóides, entre outras (CRONSTEIN, 1998).

Por outro lado, a lista de inibidores endógenos da inflamação tem permanecido pequena. Neste grupo encontramos glicocorticóides, mediadores lipídicos, adenosina, inibidores endógenos de citocinas pró-inflamatórias e citocinas antiinflamatórias (CRONSTEIN, 1998).

A IL-10, TGF $\beta$ , IL-4 e IL-13 pertencem ao grupo de citocinas que possui propriedades antiinflamatórias. Estas propriedades decorrem da capacidade destas citocinas de diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  e algumas quimiocinas (CHOMARAT, et al., 1995; DELEURAN et al., 1995; HART et al., 1988; MORI et al., 1995; JORDAN et al., 1997; SEITZ et al., 1996).

A IL-13 compartilha várias atividades com a IL-4, entre elas, a indução da síntese de IgG<sub>4</sub> e IgE (PUNNONEN et al., 1993), indução da expressão de CD23 em monócitos e células B (PUNNONEN et al., 1993), estimulação da proliferação de

células B (COCKS et al., 1993), aumento da secreção de IL-1ra por monócitos e polimorfonucleares estimulados (DELEURAN et al., 1995; VANNIER et al., 1992; FENTON et al., 1992) e inibição da indução das enzimas COX-2 e NOS-2, envolvidas na produção de prostaglandinas e óxido nítrico, respectivamente (ALAAEDDINE et al., 1999; HART et al., 1988; SEITZ et al., 1996).

As citocinas pró-inflamatórias medeiam a hiperalgesia induzida por diversos estímulos. Por outro lado, a IL-4 e a IL-13 atuam na estimulação do sistema imune e na inibição da inflamação. Estas citocinas inibem a liberação de  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (de WALL MALEFYT et al., 1991; 1993), e podem, por este motivo, ter importante papel no controle da gênese da dor inflamatória

Dessa forma, no presente trabalho, nosso objetivo foi investigar os efeitos anti-hiperalgésicos da IL-4 e IL-13, utilizando um método de hiperalgesia mecânica (teste de pressão em patas de ratos). Neste método, a carragenina e a bradicinina têm sido empregadas para induzir inflamação (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993). Estas substâncias também são utilizadas para induzir inflamação em outros modelos, como, por exemplo, na metodologia de incapacitação articular em ratos (TONUSSI e FERREIRA, 1992; TONUSSI e FERREIRA, 1997 ).

No modelo por nós utilizado, a carragenina causa hiperalgesia através da liberação de bradicinina, a qual inicia a liberação de uma cascata de citocinas (FERREIRA et al., 1993). A bradicinina estimula a liberação de  $TNF\alpha$ , que é considerado uma citocina pivô nesta cascata porque induz a liberação de: a) IL-6 e IL-1 $\beta$ , que estimulam a produção dos metabólitos da COX (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992) e b) IL-8 que estimula a produção de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 1991).

Em nossos estudos demonstramos que o pré-tratamento i.pl com 2,5 ; 5,0 ou 10 ng de IL-4 inibe de maneira dose-dependente a hiperalgisia induzida por carragenina (36, 65 e 81%, respectivamente, Figura 4). A hiperalgisia induzida pela bradicinina também foi inibida de maneira dose-dependente pelo pré-tratamento com 2,5 ; 5,0 ou 10 ng de IL-4 (33, 53 e 84%, respectivamente, Figura 6).

A administração local de IL-13 (2,5; 5,0 ou 10 ng, i.pl.) inibiu de maneira dose-dependente as respostas hiperalgésicas induzidas pela carragenina (39, 67 e 88%, respectivamente, Figura 5) e bradicinina (14, 55 e 79%, respectivamente, Figura 7).

Nesta primeira etapa de nossos estudos observamos que a dose de 10 ng de IL-4 ou IL-13 causou a inibição máxima da hiperalgisia induzida por carragenina e bradicinina, pois mesmo duplicando-se esta dose, o efeito anti-hiperalgésico destas citocinas não é aumentado. Este efeito anti-hiperalgésico da IL-4 e IL-13 parece ser conseqüência da sua capacidade em inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias, já que na hiperalgisia induzida pela carragenina, a bradicinina é formada e inicia a liberação de  $TNF\alpha$  (TIFFANY e BURCH, 1989; FERREIRA et al., 1993). O  $TNF\alpha$ , por sua vez, é o pivô de liberação de outras citocinas.

Com a mesma metodologia que nós utilizamos, POOLE et al. (1995), demonstraram que a IL-10 inibe a hiperalgisia induzida por  $TNF\alpha$ .

Investigamos em seguida, os efeitos da IL-4 sobre a hiperalgisia induzida pelo  $TNF\alpha$ . A injeção de IL-4 (2,5; 5,0 ou 10 ng, i.pl.) 30 min antes da injeção de  $TNF\alpha$  inibiu de maneira dose-dependente a hiperalgisia induzida por este estímulo (6, 55 e 86%, respectivamente, Figura 8). A dose de 10 ng inibiu completamente a resposta induzida pelo  $TNF\alpha$ .

O pré-tratamento intraplantar com 2,5 ; 5,0 ou 10 ng de IL-13 inibiu de maneira dose-dependente a hiperalgisia induzida por TNF $\alpha$  (17, 52 e 82%, respectivamente, Figura 9). A maior dose de IL-13 inibiu completamente a resposta induzida pelo TNF $\alpha$ .

O TNF $\alpha$  induz hiperalgisia através da liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  (CUNHA et al., 1992) que ativam o componente de PGs e IL-8, que ativa o componente simpático. O fato de que a maior dose utilizada tanto de IL-4 quanto de IL-13 inibem completamente a hiperalgisia induzida pelo TNF $\alpha$  sugere que estas citocinas estão impedindo a liberação ou a ação da IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, que formam o elo entre o TNF $\alpha$  e os componentes que sensibilizam diretamente os nociceptores, ou seja as PGs e as aminas simpatomiméticas.

Conforme já citamos na introdução deste trabalho, o LPS induz hiperalgisia através da liberação de uma cascata de mediadores, da mesma forma que a carragenina. Portanto, este estímulo também é utilizado com o objetivo de induzir a liberação dos mediadores finais.

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a hiperalgisia induzida pelo LPS pode ser inibida completamente pelo pré-tratamento realizado com IL-13 (dados não mostrados).

Em estudos paralelos demonstramos que a liberação *in vitro* de IL-1 $\beta$  por macrófagos murinos ativados por LPS foi parcialmente inibida pelo pré- tratamento das células com IL-4 (CUNHA et al., 1999).

Os dados obtidos por POOLE et al. (1995) demonstraram que o pré-tratamento por 30 min com IL-10 inibiu a hiperalgisia induzida por IL-1 $\beta$ , em cerca de 75%,

mostrando um papel anti-hiperalgésico potente para esta citocina inibitória. Esse resultado foi considerado surpreendente, pois a IL-1 $\beta$  estimula a produção de PGs, as quais sensibilizam diretamente o nociceptor, ou seja, a IL-1 $\beta$  induz hiperalgesia por um mecanismo que não requer a produção de citocinas pró-inflamatórias sensíveis à IL-10. Neste mesmo estudo, experimentos *in vitro* utilizando células mononucleares periféricas humanas estimuladas com IL-1 $\beta$  ou LPS demonstraram que a IL-10 inibe de maneira dose-dependente a produção de PGE<sub>2</sub>.

Nosso próximo passo foi investigar os efeitos da IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$ . O pré-tratamento com IL-4 (10 ng, i.pl.) por 30 min (Figura 10A) ou 2 h (Figura 12) não alterou a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ . O mesmo resultado foi obtido com o pré-tratamento realizado com IL-13 (10 ng, i.pl.) por 30 min (Figura 11A) ou 2 h (Figura 13).

Por outro lado, quando o pré-tratamento com IL-4 ou IL-13, nas mesmas doses previamente utilizadas foi realizado uma única vez 12 h antes ou duas vezes, 12 e 2 h antes da administração da IL-1 $\beta$ , a hiperalgesia induzida por esta citocina foi inibida. O pré-tratamento com IL-4 por 12 h inibiu a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$  em 30% e as duas injeções feitas 12 e 2 h antes, preveniram a instalação desta hiperalgesia (cerca de 74%, Figura 12). A IL-13 inibiu de maneira similar a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$  (35 e 77%, para pré-tratamento realizados 12 h ou 12 e 2 h, respectivamente, Figura 13).

Em estudos paralelos realizados por nosso grupo, demonstramos os efeitos da IL-4 sobre a produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos ativados por LPS (CUNHA et al.,1999). A IL-4 inibiu de maneira dose-dependente a produção de PGE<sub>2</sub> somente

quando os macrófagos foram pré-tratados com IL-4 por 12 h. O tratamento com IL-4 realizado 2 h antes da injeção de IL-1 $\beta$  não afetou a produção deste prostanóide. Estes dados corroboram os resultados obtidos na metodologia de pressão em patas de ratos, onde somente os pré-tratamentos com IL-4 por 12 (uma injeção) ou 12 e 2 h (duas injeções) foram capaz de inibir os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-1 $\beta$ . Estes resultados são consistentes com a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$  via liberação de PGs (FERREIRA et al., 1988; SEIBERT et al., 1994).

Os resultados obtidos com o tratamento realizado com a injeção i.pl. de IL-10 demonstraram ausência de efeitos desta citocina sobre a hiperalgesia induzida pela IL-8 (POOLE et al., 1995).

Nosso próximo passo foi investigar os efeitos da IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela IL-8.

Estudos realizados por CUNHA et al. (1991) , utilizando o mesmo teste de hiperalgesia mecânica por nós utilizado, demonstraram que a IL-8 induz hiperalgesia através da liberação de aminas simpatomiméticas, pois a hiperalgesia induzida por esta citocina foi inibida completamente pelo tratamento com  $\beta$ -bloqueadores ou antagonistas seletivos de receptores D<sub>1</sub> para dopamina. As aminas simpatomiméticas sensibilizam diretamente o nociceptor a estímulos mecânicos (NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

Os resultados obtidos neste estudo que demonstram a ausência de efeitos da IL-4 (10 ng, i.pl.) injetada 30 min (Figura 10B), 2, 12 ou 12 e 2 h (Figura 12) antes da injeção de IL-8 sugerem que a IL-4 não é capaz de inibir a produção ou a liberação de aminas simpatomiméticas, pois a IL-8 induz hiperalgesia mecânica dependente da participação das aminas (CUNHA et al., 1991).



A ausência de efeitos da IL-13 (10 ng, i.pl.) injetada 30 min (Figura 11B), 2, 12 ou 12 e 2 h (Figura 15) antes da administração de IL-8 também foi constatada, ou seja, esta citocina inibitória não atua inibindo a produção de aminas induzida pela IL-8.

Estes resultados reforçam a sugestão de que a hiperalgesia induzida pela IL-8 resulta da liberação de outros mediadores, que não os produtos da ciclooxigenase (CUNHA et al., 1991).

Os efeitos da IL-10 também foram investigados sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Os dados mostraram que a IL-10 não é capaz de alterar a hiperalgesia induzida por este estímulo (POOLE et al., 1995).

Em seguida, investigamos os efeitos da IL-4 e IL-13 sobre a hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>.

A injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> não foi inibida pelo pré-tratamento por 30 min com IL-4 (10 ng, i.pl., Figura 10C) ou IL-13 (10 ng, i.pl., Figura 11C). Este resultado é consistente com o fato de que a PGE<sub>2</sub> é um mediador hiperalgésico final, que sensibiliza diretamente o nociceptor (FERREIRA et al., 1981).

Utilizando um anticorpo monoclonal para a IL-10, POOLE et al. (1995) demonstraram que esta citocina possui um importante papel endógeno, limitando o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e TNF $\alpha$ , mas não por IL-8. As doses dos estímulos hiperalgésicos utilizados foram 10 vezes menores do que aquelas empregadas usualmente na indução da hiperalgesia mecânica, para possibilitar a detecção da modulação inibitória realizada pela IL-10. Dessa forma, o pré-tratamento com o anticorpo monoclonal para a IL-10 potencializou a hiperalgesia induzida por pequenas doses de carragenina e TNF $\alpha$ .

Em nossos estudos utilizamos protocolo semelhante para avaliar a participação endógena da IL-4 e IL-13 no processo hiperalgésico, ou seja, utilizamos pequenas doses de carragenina, bradicinina, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 e observamos se o pré-tratamento com anticorpos monoclonais para IL-4 ou para a IL-13 era capaz de potencializar a hiperalgesia induzida por estes estímulos.

As respostas hiperalgésicas induzidas pela carragenina (Figura 16), bradicinina (Figura 18) e TNF $\alpha$  (Figura 20) foram potencializadas pelo tratamento com dois diferentes anticorpos monoclonais para IL-4, o BVDG e o 11B11, mas não pelo anticorpo controle.

O anticorpo monoclonal para IL-13, mas não o anticorpo controle, também potencializou a hiperalgesia induzida por pequenas doses de carragenina (Figura 17), bradicinina (Figura 19) e TNF $\alpha$  (Figura 21).

Tanto a administração do anticorpo monoclonal para a IL-4, quanto do anticorpo monoclonal para a IL-13 não alterou a resposta hiperalgésica induzida pela IL-1 $\beta$  (Figuras 22 e 23) ou IL-8 (Figuras 24 e 25).

Estes dados sugerem fortemente que a IL-4 e a IL-13 endógenas possuem importante papel no controle da hiperalgesia inflamatória. A inatividade dos anticorpos monoclonais para IL-4 e IL-13 em potencializar os efeitos hiperalgésicos da IL-1 $\beta$  (Figuras 13 e 27) sugere que o principal efeito dessas citocinas endógenas na hiperalgesia inflamatória é a inibição da liberação de citocinas e não a inibição da síntese de prostaglandinas, as quais sensibilizam diretamente os nociceptores (FERREIRA e LORENZETTI, 1981; NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

A hiperalgesia induzida pela IL-8 também não foi potencializada pelo tratamento com anticorpos monoclonais para a IL-4 e IL-13 (Figuras 14 e 28). A IL-8 atua através da liberação de aminas simpatomiméticas e os dados sugerem que a IL-4 e IL-13 não interferem neste processo.

No intuito de avaliar se os efeitos inibitórios da IL-4 e IL-13 eram mediados pela IL-10, ZURAWSKI e VRIES (1994), observaram que a IL-4 e IL-13 continuaram a inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos ativados, mesmo em presença de anticorpos monoclonais para a IL-10, sugerindo que os efeitos supressivos destas citocinas não estão relacionados à produção endógena de IL-10. Os mesmos autores observaram, ainda, que os efeitos modulatórios da IL-13 sobre monócitos permanecem em presença de anticorpos monoclonais específicos para a IL-4, sugerindo que a IL-13 age independentemente da IL-4. Estes dados podem sugerir que um estímulo que induza a liberação de qualquer uma destas citocinas inibitórias, pode contribuir para o controle da dor inflamatória, pois a atividade antiinflamatória de uma citocina parece ser independente da participação da outra. No entanto, mais estudos precisam ser realizados no intuito de esclarecer esta hipótese.

A IL-4 e a IL-13 são liberadas principalmente por linfócitos Th<sub>2</sub> e por mastócitos (LORD e LAMB, 1996; TUNON de LARA et al., 1994; BURD et al., 1995). Em nossos estudos, montamos um protocolo para determinar quais desses tipos celulares estão liberando IL-4 e IL-13 durante a hiperalgesia inflamatória.

A participação dos linfócitos T foi investigada com o uso de ratos da linhagem Nude-Rowett, os quais não possuem timo (a ausência do timo foi confirmada por análise histopatológica e pelo ensaio de proliferação de esplenócitos). Para avaliar a

participação dos mastócitos, utilizamos animais depletados destas células com o tratamento crônico com o composto 48/80 (DI ROSA et al., 1971).

Testamos a capacidade de anticorpos monoclonais para IL-4 e IL-13 em potencializar os efeitos hiperalgésicos induzidos pela injeção i.pl. bradicinina em ratos atímicos e em ratos depletados de mastócitos.

Os dados de que o anticorpo monoclonal para a IL-4 potencializou o efeito hiperalgésico da bradicinina em ratos atímicos (figura 26A), mas não em animais depletados de mastócitos (Figura 26B) sugerem fortemente que os mastócitos são a origem da IL-4 que está limitando a hiperalgesia inflamatória.

A confirmação das evidências de que os mastócitos são a origem da IL-4 foi obtida em um experimento com dextrana que é uma substância que desgranula mastócitos (NISHIDA et al., 1978; NISHIDA e TOMIZAWA, 1980). A injeção local de dextrana em patas traseiras de ratos induz a formação de edema. Estudos têm demonstrado que a liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos é responsável pela formação do edema induzido pela dextrana (NISHIDA e TOMIZAWA, 1980; NISHIDA et al., 1978).

Embora a dextrana seja um potente indutor de edema, a administração i.pl. de dextrana não induz hiperalgesia mecânica em ratos (Figura 26C). Porém o pré-tratamento por 30 min realizado com o anticorpo monoclonal para a IL-4, BVDG, possibilita a detecção de hiperalgesia mecânica induzida pela dextrana, ou seja, com a realização do tratamento com o anticorpo monoclonal para a IL-4, a dextrana é capaz de induzir hiperalgesia (medida 3 h depois), em ratos não previamente sensíveis a este agente (Figura 26C).

Além de liberar histamina, os mastócitos ativados por um estímulo como a dextrana liberam vários outros mediadores, que podem ser divididos em três grupos: mediadores pré-formados, associados a grânulos; mediadores derivados de lipídeos e citocinas, entre elas, a IL-4 (METCALFE et al., 1997). Isto pode sugerir que a injeção local de dextrana não causa hiperalgisia porque induz a liberação da IL-4. O fato de que o tratamento com o anticorpo monoclonal para a IL-4 possibilita a detecção de hiperalgisia induzida pela dextrana demonstra a presença da IL-4 na modulação inibitória dos efeitos hiperalgésicos da dextrana.

Por outro lado, o anticorpo monoclonal para a IL-13 potencializou a hiperalgisia induzida pela bradicinina nos animais depletados de mastócitos (figura 27B) e não teve efeito algum nos animais atímicos (figura 27A). Estes dados sugerem que os mastócitos não são os tipos celulares responsáveis pela liberação endógena de IL-13, mas que os linfócitos podem ser a origem da IL-13.

Nossos dados sugerem que embora a IL-4 e a IL-13 possuam ações muito parecidas na modulação da hiperalgisia inflamatória, as células que estão liberando estas duas citocinas durante a hiperalgisia parecem ser diferentes: a IL-4 pode estar sendo liberada por mastócitos residentes e a IL-13 por linfócitos T.

Com os resultados obtidos neste trabalho, podemos incluir a participação da IL-4 e IL-13 na cascata de liberação de citocinas apresentada na Figura 2, e assim, teremos o esquema da Figura 28, e concluir que:

- 1) a IL-4 e a IL-13 possuem atividades anti-hiperalgésicas. Elas inibem de maneira dose-dependente a hiperalgisia mecânica induzida por estímulos liberadores de citocinas como carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ . Seus

efeitos inibitórios avaliados 3 h após o início da resposta hiperalgésica parecem ser, portanto, conseqüência da inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o  $TNF\alpha$ , a  $IL-1\beta$  e a  $IL-8$ ;

- 2) na fase tardia da resposta hiperalgésica essas citocinas antiinflamatórias,  $IL-4$  e  $IL-13$ , podem estar inibindo a expressão de  $COX-2$ , uma vez que tanto o tratamento com a  $IL-4$  quanto com a  $IL-13$  feito 12 h antes da  $IL-1\beta$ , inibiu a hiperalgesia mecânica induzida por esta citocina, e a  $IL-1\beta$  induz hiperalgesia dependente da participação de PGs;
- 3) as células responsáveis pela liberação destas citocinas durante a hiperalgesia inflamatória são diferentes: a  $IL-4$  parece ser liberada por mastócitos residentes e a  $IL-13$  por linfócitos T;
- 4) estímulos como a carragenina e o LPS induzem reações inflamatórias, e em paralelo induzem hiperalgesia. Esta hiperalgesia, que pode ser quantificada experimentalmente, é o resultado da liberação de mediadores pró- e antiinflamatórios. Nossos dados mostram a importância das citocinas antiinflamatórias endógenas liberadas num processo hiperalgésico, pois o tratamento realizado com anticorpos monoclonais para  $IL-4$  ou  $IL-13$  potencializa os efeitos hiperalgésicos induzidos pela carragenina, bradicinina e  $TNF\alpha$ . Esta potencialização é conseqüência da predominância de mediadores pró-inflamatórios, uma vez que os

anticorpos monoclonais neutralizaram os efeitos dos mediadores inibitórios. Por outro lado, estímulos como a dextrana revelam que, quando há a liberação predominante de mediadores inibitórios, como a IL-4, o processo hiperalgésico não ocorre. Dessa forma, circunstâncias que levem à liberação maciça de mediadores antiinflamatórios são capazes de controlar a hiperalgesia. O desenvolvimento de substâncias que estimulem a liberação destes mediadores pode ser uma alternativa terapêutica para o controle da dor inflamatória.

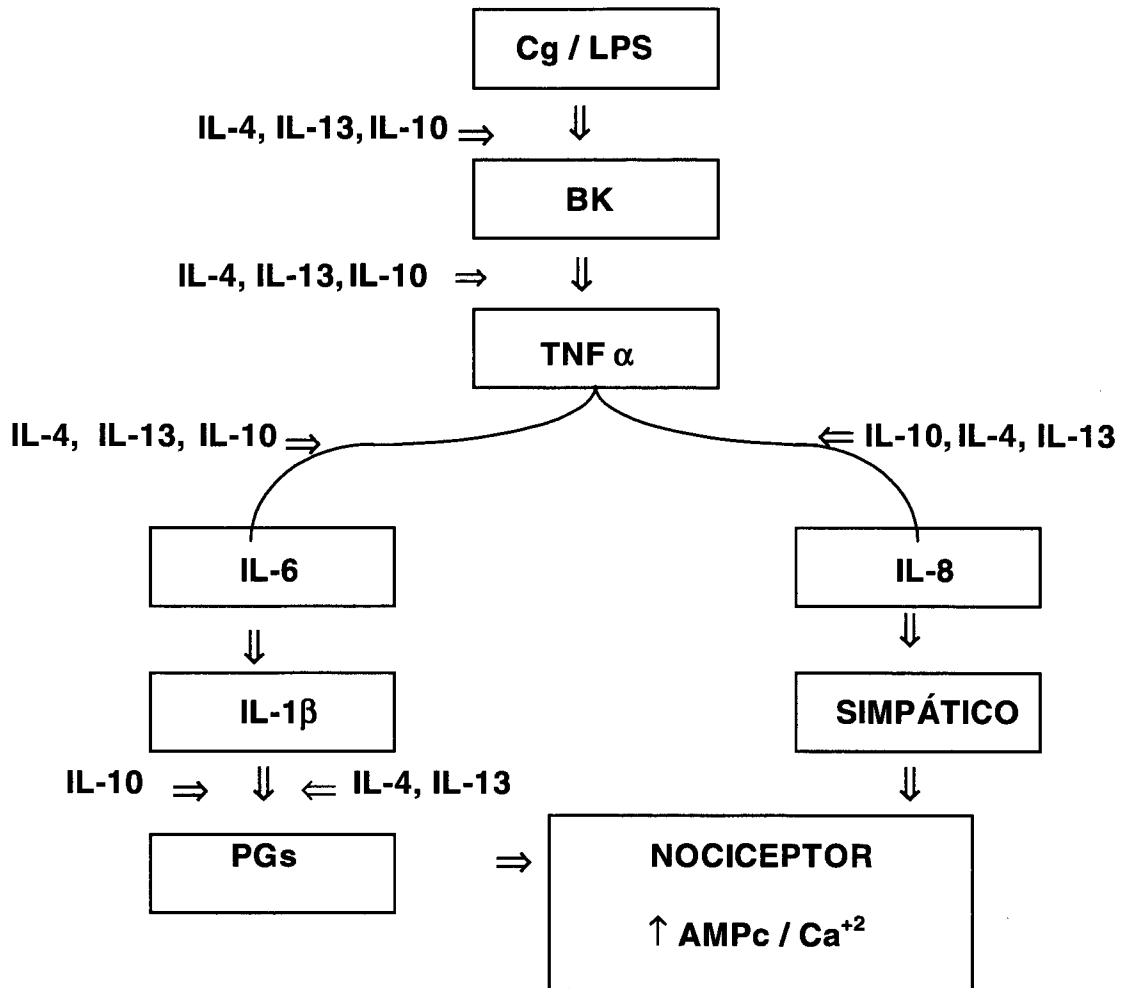


Figura 28 Esquema da possível cascata de liberação de mediadores envolvidos na sensibilização do nociceptor, indicando os pontos de inserção da IL-10, IL-4 e IL-13.





## 6 PUBLICAÇÕES

Os dados apresentados neste trabalho deram origem às seguintes publicações:

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H. e FERREIRA, S.H.

Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 45-50, 1999.

Lorenzetti, B.B.; Cunha, F.Q.; Veiga, F.H.; Poole, S. e Ferreira S.H. Effects of the interleukin-13 on the inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** (no prelo).

**SUMMARY**

---

## 7 SUMMARY

1. The present study investigates the effect of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) on responses to intraplantar injection of carrageenin, bradykinin, tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) interleukin-8 (IL-8) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in a model of mechanical hyperalgesia in rats. The role of endogenous IL-4 and IL-13 in limiting inflammatory hyperalgesia induced by different stimuli and the cellular sources of the IL-4 and IL-13 were also investigated.
2. IL-4 or IL-13, injected 30 min before administration of the stimuli, inhibited hyperalgesic responses induced by injection of carrageenin, bradykinin and TNF $\alpha$ , but not that induced by IL-1 $\beta$ , IL-8 and PGE<sub>2</sub>. When IL-4 or IL-13 were injected 12 or 12 + 2 h before the injection of IL-1 $\beta$ , inhibition happened. However in the case of IL-8 injection no inhibition was observed. These data suggest that in the early phase of the hyperalgesic response, IL-4 and IL-13 appear to achieve their effects by inhibiting the production of hyperalgesic cytokines (e.g. TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ). In the later phase of the hyperalgesic response, the effect of IL-4 and IL-13 also may result from inhibition of the expression of COX-2.
3. Two monoclonal antibodies to IL-4 and one monoclonal antibody to IL-13 injected 30 minutes before intraplantar injections of carrageenin, bradykinin and TNF $\alpha$  potentiated responses, measured 3 h after injection of these agents. These data suggest that endogenous IL-4 and IL-13 have an important role in limiting

inflammatory hyperalgesia. The failure of the monoclonal antibodies to IL-4 and IL-13 to enhance the hyperalgesic effects of IL-1 $\beta$  and IL-8 suggest that the predominant effect of endogenous IL-4 and IL-13 in inflammatory hyperalgesia is to inhibit the release of cytokines, rather than of prostaglandins, which sensitize nociceptors.

4. The monoclonal antibody to IL-4 potentiated the hyperalgesic effect of bradykinin in athymic rats, but not in animals depleted of mast cells. This strongly suggests that mast cells were the source of the endogenous IL-4 that limited the inflammatory hyperalgesia. Further evidence supporting mast cells as the source of the IL-4 was provided by the experiment with dextran, which disrupts mast cells. Thus, a monoclonal antibody to IL-4 induced a hyperalgesic response to dextran in (wild type) rats not previously sensitive to this agent.
5. The monoclonal antibody to IL-13 potentiated the hyperalgesia induced by bradykinin in animals depleted of mast cells, like in normal animals, but not in athymic rats. This suggests that the lymphocytes are the source of IL-13.
6. Our data suggest that although IL-13 and IL-4 have a similar role in the inflammatory hyperalgesia, the cellular sources of these cytokines during the hyperalgesia are different: IL-4 is released mainly by the resident mast cells and IL-13 by the lymphocytes.
7. In conclusion, our results suggest that events that induce release of anti-inflammatory cytokines are able to control the hyperalgesia. The production

of substances that stimulate the release of these mediators may be useful as a new therapeutic alternative for pain control.

---

**RESUMO**

## 8 RESUMO

1. O presente estudo utilizou um modelo de hiperalgesia mecânica (teste de Randall-Selitto modificado) para investigar os efeitos da interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) sobre a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina, bradicinina, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-8 (IL-8) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para investigar a participação destas citocinas inibitórias (IL-4 e IL-13) endógenas na hiperalgesia induzida por diferentes estímulos. Também foi pesquisado, qual a origem celular destas citocinas liberadas durante a hiperalgesia inflamatória.
2. O pré-tratamento local com IL-4 ou IL-13 inibiu as respostas hiperalgésicas induzidas pela injeção local de carragenina, bradicinina e TNF $\alpha$ , mas não a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>. Quando a IL-4 ou a IL-13 foram injetadas uma única vez 12 h antes ou duas vezes, 12 e 2 h antes da administração da IL-1 $\beta$  ou IL-8, observou-se um efeito inibitório sobre a hiperalgesia induzida pela IL-1 $\beta$ , mas não pela IL-8. Os dados sugerem que no início da resposta hiperalgésica, tanto a IL-4 quanto a IL-13 parecem atuar inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e que numa fase tardia da resposta hiperalgésica as citocinas antiinflamatórias podem estar inibindo a expressão de COX-2.



3. As respostas hiperalgésicas induzidas pela administração de carragenina, bradicinina e  $TNF\alpha$  foram potencializadas pelo tratamento das patas com dois diferentes anticorpos monoclonais (IgG) específicos para IL-4 e um anticorpo monoclonal (IgG) específico para IL-13. Estes dados sugerem fortemente que essas citocinas endógenas possuem importante papel na regulação da hiperalgesia inflamatória. A ineficácia dos anticorpos monoclonais para IL-4 e IL-13 em potencializar os efeitos hiperalgésicos induzidos pela IL-1 $\beta$  sugere que o efeito predominante dessas citocinas endógenas na hiperalgesia inflamatória é a inibição da liberação de citocinas, mais do que da síntese de prostaglandinas, as quais sensibilizam diretamente os nociceptores.
4. O anticorpo monoclonal para IL-4 potencializou o efeito hiperalgésico da bradicinina em ratos atímicos, da mesma forma que em ratos normais, porém o mesmo não aconteceu em animais depletados de mastócitos, sugerindo que os mastócitos são a origem da IL-4 que está modulando a hiperalgesia inflamatória. A confirmação das evidências de que os mastócitos são a origem da IL-4 foi obtida em um experimento com dextrana, que desgranula mastócitos. Os resultados demonstraram que o anticorpo monoclonal para IL-4 induziu resposta hiperalgésica à dextrana, em ratos não previamente sensíveis a este agente.

5. Por outro lado, o anticorpo monoclonal para a IL-13 potencializou a hiperalgesia induzida pela bradicinina nos animais depletados de mastócitos, da mesma forma que em animais normais e não teve efeito algum nos animais atímicos, sugerindo que os linfócitos são a origem da IL-13.
  
6. Nossos dados sugerem que, embora a IL-4 e a IL-13 possuam ações muito parecidas na modulação da hiperalgesia inflamatória, as células que estão liberando estas duas citocinas durante a hiperalgesia são diferentes: a IL-4 está sendo liberada por mastócitos residentes e a IL-13 por linfócitos.
  
7. Dessa forma, circunstâncias que levem à liberação maciça de citocinas antiinflamatórias são capazes de controlar a hiperalgesia. A produção de substâncias que estimulem a liberação destes mediadores pode ser uma nova alternativa terapêutica para o controle da dor inflamatória.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, A.K.; LICHTMAN, A.H. e POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*, Revinter, 3ª ed., Rio de Janeiro, 486 p., 1999.

AHMAD, S.; CHODHRY, M.A.; SHANKAR, R. e SAYEED, M.M. Transforming growth factor- $\beta$  negatively modulates T-cell responses in sepsis. **FEBS Lett.**, 402: 213-218, 1997.

ALAAEDDINE, N.; DI BATISTA, J.A.; PELLETIER, J.P.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J.M. e MARTEL-PELLETIER, J. Inhibition of tumour necrosis factor alpha-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production by the anti-inflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. **Arthr. Rheum.**, 42: 710-718, 1999.

ALI, Z.; MEYER, R.A. e CAMPBELL, J.N. Secondary hyperalgesia to mechanical but not heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. **Pain**, 68: 401-411, 1996.

AL-RAMADI, B.K.; MEISSLER, J.J.; HUANG, D. e EISENSTEIN, T.K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. **Eur. J. Immunol.**, 22: 2249-2254, 1992.

- BACCAGLINI, P.I. e HOGAN, P.G. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 80: 594-598, 1983.
- BAKHLE, Y.S. e BOTTING, R.M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediat. Inflamm.**, 5: 305-323, 1996.
- BERNHEIM, H.A.; GILBERT, T.M. e STITT, J.T. Prostaglandin E<sub>2</sub> levels in third ventricular cerebrospinal fluid of rabbits during fever and changes in body temperature. **J. Physiol.**, 301: 69-78, 1980.
- BHOOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D. e WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.
- BURD, P.R.; THOMPSON, W.C.; MAX, E.E. e MILLS, F.C. Activated mast cells produce interleukin 13. **J. Exp. Med.**, 181: 1373-1380, 1995
- CALLARD, R.E.; MATHEUS, D.J. e HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? **Immunol. Today**, 17: 108-110, 1996.
- CASSATELLA, M. A.; MEDA, L.; BONORA, S.; CESKA, M. e CONSTANTIN, G. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumour necrosis factor and IL-1 $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, 178: 2207-2211, 1993.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. e MIOSSEC, P. Differential effects of interleukins 10 and 4 on the production of interleukin-6 by blood and synovium monocytes in rheumatoid arthritis. **Arthr. Rheum.**, 38: 1046-1054, 1995.

CHOMARAT, P. e BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. **Int. Rev. Immunol.**, 17: 1-52, 1998.

COCKS, B.G.; de WAAL MALEFYT, R.; GALIZI, J.; de VRIES, J.E. e AVERSA, G. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. **Int. Immunol.**, 5: 657-663, 1993.

COLLIER, J.G.; RARIM, S.M.M.; ROBINSON, B. e SOMERS, K. Action of prostaglandin A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> on superficial hand veins of man. **Br. J. Pharmacol.**, 44: 374-375, 1972.

CRONSTEIN, B.N. Adenosine and its receptors during inflammation. In: **Molecular and Cellular Basis of Inflammation**, C.N.Serhan e P.A. Ward (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1998.

CRUNKHORN, P. e WILLIS, A.L. Cutaneous reaction to intradermal prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, 41: 49-56, 1971.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. e FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, 104: 765-767, 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 660-664, 1992.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H. e FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 45-50, 1999.

DAHL, J.B.; BRENNUM, J.; ARENDT-NIELSEN, L.; JENSEN, T.S. e KEHLET, H. The effect of pre versus post-injury infiltration with lidocaine on thermal and mechanical hyperalgesia after heat injury to the skin. **Pain**, 53: 43-51, 1993.

DELEURAN, B.; IVERSEN, L.; DELEURAN, M.; YSSEL, H.; KRAGBALLE, K.; STENGAARD-PEDERSEN, K. e THESTRUP-PEDERSEN, K. Interleukin-13 suppresses cytokine production and stimulates the production of 15-HETE in PBMC. A comparison between IL-4 and IL-13. **Cytokine**, 7: 319-324, 1995.

DEVOR, M. e SELTZER, Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: **Textbook of Pain**, P.D. Wall and Melzack (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburg, pp. 129-163, 1989.

de WALL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIDGOR, C. e VRIES, J.E. IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, 174: 1209-1220, 1991.

de WALL MALEFYT, R.; FIDGOR, C.G.; HUIJBENS, R.; MOHAN-PETERSON, S.; BENNETT, B.; CULPEPPER, J.; DANG, W.; ZURAWSKI, G. e VRIES, J.E. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. **J. Immunol.**, 151: 6370-6381, 1993.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P. e WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **J. Pathol.**, 104: 15-29, 1971.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75: 125-131, 1995.

DUARTE, I.D.G.; SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric-oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 217: 225-227, 1992.

ELIAS, J.A.; LENTZ, V.; CUMMINGS, P.J. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of IL-6 production by unstimulated and IL-1-stimulated human fibroblasts. **J. Immunol.**, 146: 3437-3443, 1991.

ENDO, T.; OGUSHI, F. e SABURO, S. LPS- dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down regulated by IL-13, but not by IFN $\gamma$ . **J. Immunol.**, 156: 2240-2246, 1996.



FENTON, M.J.; BURAS, J.A. e DONELLY, R.P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. **J. Immunol.**, 149: 1283-1288, 1992.

FERREIRA, S.H. e NAKAMURA, M. Prostaglandins hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. **Prostaglandins**, 18: 201-208, 1979.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. e CASTRO, A.M.S. The hyperalgesic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin. **Prostaglandins**, 16: 31-37, 1978.

FERREIRA, S.H. e LORENZETTI, B.B. Prostaglandin hyperalgesia, IV: a metabolic process. **Prostaglandins**, 21: 789-792, 1981.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F. e POOLE, S. Interleukin 1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, 334: 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G. e LORENZETTI, B.B. Molecular basis of acetylcholine and morphine analgesia. In: **Drugs in inflammation**, Eds. Parnham, M.J.; Bray, M.A.; Van den Berg, W.B., p. 101-106, 1991.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. e POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol**, 110: 1212-1231, 1993.

FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. e HYSLOP, S. Role of the inducible forms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammatory pain. In: **Inducible Enzymes in the Inflammatory Response**, Eds. Willoughby, D.A. e Tomlinson, A., p. 149-167, 1999.

HANNINGTON-KIFF, J.G. Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. **Lancet**, 1: 119-120, 1974.

HART, P.H.; VITTI, G.F.; BURGESS, D.R.; WHITTY, G.A.; PICCOLI, D.S. e HAMILTON, J.A. Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumour necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1, and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 3803-3807, 1989.

HART, P.H.; et al. Comparison of the suppressive effects of interleukin-10 and interleukin-4 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. **Immunology**, 84: 536-542, 1995.

HOWARD, M.; FARRAR, J.; HILFIKER, H.; JOHNSON, B.; TAKATSU, K.; HAMAOKA, T. e PAUL, W.E. **J. Exp. Med.**, 155: 914-923, 1982.

JAGGAR, S.I.; HABIBI, S. e RICE, A.S.C. The modulatory effects of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists upon viscerovisceral hyper-reflexia in a rat model of visceral hyperalgesia. **Pain**, 75: 169-176, 1998.

- JORDAN, N.J.; WATSON, M.L.; WILLIAMS, R.J.; ROACH, A.G.; YOSHIMURA, T. e WESTWICK, J. Chemokine production by human vascular smooth muscle cells: modulation by IL-13. **Br. J. Pharmacol.**, 122: 749-757, 1997.
- JUNGER, H. e SORKIN, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF $\alpha$ . **Pain**, 85: 145-154, 2000.
- KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y. e TAKAGI, H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception In the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **Br. J. Pharmacol.**, 112: 547-550, 1994.
- KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K. e KODA, H. Possible involvement of the EP<sub>2</sub> receptor subtype in PGE<sub>2</sub>-induced enhancement of the heat response of nociceptors. **Neurosci. Lett.**, 175: 71-73, 1994.
- LIEW, F.Y.; LI, Y.; SEVERN, A.; MILLOTT, S.; SCHIMIDT, J.; SALTER, M. e MONCADA, S. A possible pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th<sub>2</sub>) cells of a Th<sub>1</sub> cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **Eur. J. Immunol.**, 21: 2489-2494, 1991.
- LORD, C.J.M. e LAMB, J.R. TH2 cells in allergic inflammation: a target of immunotherapy. **Clin. Exp. Allergy**, 26: 756-765, 1996.

- LORENZETTI, Berenice B. Estudo sobre a ação anti-algésica central e periférica de drogas tipo aspirina. Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 1979, p. 14-21.
- LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Prostaglandin hyperalgesia: a cAMP/Ca<sup>++</sup> dependent process. **Prostaglandins**, 18: 179-190, 1981.
- LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm. Res.**, 45: 308-311, 1996.
- MALMBERG, A.B. e YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthase inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, 54: 291-300, 1993.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F. e BACHVAROV. The B<sub>1</sub> receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.**, 50: 357-386, 1998.
- MARNETT, J.L. e KALGUTKAR, A.S. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. **TIPS**, 20: 465-469, 1999.
- MARU, A. e JACKSON, S.K. Opposite effects of interleukin-4 and interleukin-10 on nitric oxide production in murine macrophages. **Mediat. Inflamm.**, 5: 110-112, 1996.

MATSUKAWA, A.; HOGABOAM, C.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLN, P.M.; EVANOFF, H.L.; STRIETER, R.M. e KUNKEL, S.L. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. **J. Immunol.**, 164: 2738-2744, 2000.

McMAHON, S. KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurons in pain. **Pain**, 43: 269-272, 1990.

MELLER, S.T.; CUMMINGS, C.P.; TRAUB, R.J. e GEBHART, G.F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenin in the rat. **Neuroscience**, 60: 367-374, 1994.

METCALFE, D.D.; BARAM, D. e MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, 77: 1033-1079, 1997.

MINTY, A.; CHALON, P.; DEROCQ, J.M.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J.C.; KAGHAD, M.; LABIT, C.; LEPLATOIS, P.; LIAUZUN, P.; MILOUX, B.; MINTY, C.; CASELLAS, P.; LOISON, G.; LUPKER, J.; SHIRE, D.; FERRARA, P. e CAPUT, D. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, 362: 248-250, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. e HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P. e HART, S.L. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 198-202, 1991.

MORI, N.; SHIRAKAWA, F.; MURAKAMI, S.; ODA, S. e ETO, S. Interleukin-4 inhibits the production of interleukin-1 by adult T-cell leukemia cells. **Eur. J. Haematol.**, 55: 121-125, 1995.

MOUSLI, M.; BRONNER, C.; BOCKAERT, J.; ROUT, B. e LANDRY, Y. Interaction of substance P, compound 48/80 and mastoparan with the  $\alpha$ -subunit C-terminus of G-protein. **Immunol. Lett.**, 25: 355-358, 1990.

MOUSLI, M.; BRONNER, C.; LANDRY, Y.; BOCKAERT, J. e ROUOT, B. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. **FEBS Lett.**, 259: 260-262, 1990.

MUCHAMUEL, T.; MENON, S.; PISACANE, P.; HOWARD, M.C. e COCKAYNE, D.A. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia. Correlation with down-modulation of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-12 production. **J. Immunol.**, 158: 2898-2903, 1997.

MURATA, T.; OBIRI, N.I. e PURI, R.K. Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors (review). **Int. J. Mol. Med.**, 1: 551-557, 1998.

- NAKAMURA, M. e FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 135: 145-153, 1987.
- NISHIDA, S. e TOMIZAWA, S. Effects of compound 48/80 on dextran-induced paw edema and histamine content of inflammatory exudate. **Bioch. Pharmacol.**, 29: 1073-1075, 1980.
- NISHIDA, S.; WAGAWA, K. e TOMIZAWA, S. Correlation between histamine content in exudate and degree of edema produced by dextran. **Bioch. Pharmacol.**, 27: 2641-2646, 1978.
- NISHIYAMA, K.; BRIGHTON, B.W.; BOSSUT, D.F. e PERL, E.R. Peripheral nerve injury enhances  $\alpha_2$ -adrenergic receptor expression by some DRG neurons. **Soc. Neurosc. Abstr.**, 19: 499-, 1993.
- NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L. e DEMAREST, R.J. The human nervous system-structure and function. In: "Pain and temperature", Eds. Williams e Wlkins. 5ª ed., p.123-137, New York, 1996.
- ORLINSKA, U. e KUHN, D.C. Regulation of TXB2 and PGE2 production by TGF $\beta$ 1 in *in vitro* silica dust-exposed rat alveolar macrophage. **Mediat. Inflamm.**, 4: 413-416, 1995.
- PAUL, W.E. e OHARA, J. B cell stimulatory factor-1/interleukin-4. **Annu. Rev. Immunol.**, 5: 429-459, 1987.

PERKINS, M.N.; CAMPBELL, J.N. e DRAY, A. Antinociceptive activity of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists, des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]-BK and HOE-140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, 53: 191-197, 1993.

PERKINS, M.N. e KELLY, D. Interleukin-1 beta induced-desArg<sup>9</sup>bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacol.**, 33: 657-660, 1994.

PERL, E.R. A reevaluation of mechanisms leading to sympathetically related pain. In: **Pharmacological Approaches to the Treatment of Chronic Pain: New Concepts and Critical Issues**, Eds. Fieldset, H.L. et al., IASP press 1: 129-150, 1994.

POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. J. Pharmacol.**, 115: 684-688, 1995.

POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q. e FERREIRA, S.H. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors, tumour necrosis factor  $\alpha$  and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 649-656, 1999.

PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B.G.; MCKENZIE, A.N.; MENON, S.; ZURAWSKI, G.; de WALL MALEFTY, R. e VRIES, J.E. Interleukin-13 induces interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90: 3730-3734, 1993.



RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. e MEYER, R.A. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. **Brain**, 107: 1179-1188, 1984.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M. e CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: **Textbook of Pain**, P.D. Wall and Melzack (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburg, pp.11-57, 1989.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, 113: 233-249, 1957.

ROCKEN, M.; RACKE, M. e SHEVACH, E.M. IL-4-induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. **Immunol. Today**, 17: 225-231, 1996.

RYAN, J.J. Interleukin-4 and its receptor: Essential mediators of the allergic response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 99: 1-5, 1997.

SCHAIBLE, H.G. e SCHMIDT, R.F. Effects of experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **J. Neurophysiol.**, 54: 1109-1122, 1985.

SATO, J.; SUZUKI, S.; TAMURA, R. e KUMAZAWA, T. Norepinephrine excitation of cutaneous nociceptors in adjuvant-induced inflamed rats does not depend on sympathetic neurons. **Neurosc. Lett.**, 177: 135-138, 1994.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L. e ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, 91: 12013-12017, 1994.

SEITZ, M.; LOETSCHER, P.; DEWALD, B.; TOWBIN, H. e BAGGLIOLINI, M. Opposite effects of interleukin-13 and interleukin-12 on the release of inflammatory cytokines, cytokine inhibitors and prostaglandin E from synovial fibroblasts and blood mononuclear cells. **Eur. J. Immunol.**, 26: 2198-2202, 1996.

SEITZ, M.; LOETSCHER, P.; DEWALD, B.; TOWBIN, H.; CESKA, M. e BAGGLIOLINI, M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes-regulation by IFN- $\gamma$  and IL-4. **J. Immunol.**, 152: 2060-2065, 1994.

STANDIFORD, T.J.; STRIETER, R.M.; CHENSUE, S.W.; WESTWICK, J.; KASAHARA, K. e KUNKEL, S.L. IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. **J. Immunol.**, 145: 1435-1439, 1990.

STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M. e SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85: 3245-3249, 1988.

- TAIWO, Y.O. and LEVINE, J.D. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. **Brain Res.**, 537: 372-374, 1990.
- TIFFANY, C.W. e BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumour necrosis factor and interleukin 1 release from macrophages. **FEBS Lett.**, 247: 189-192, 1989.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48: 421-427, 1992.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, 251: 173-179, 1994.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 326: 61-65, 1997.
- TUNON DE LARA, J.M.; OKAYAMA, Y.; MCEUEN, A.R.; HEUSSER, C.H.; CHURCH, M.K. e WALLS, A.F. Release and inactivation of interleukin-4 by mast cells. In: Cells and cytokines in lung inflammation. Eds. Chignard, M.; Pretolani, M.; Renesto, P. e Vargaftig, B.B. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 725: 50-58, 1994.
- VANNIER, E.; MILLER, L.C. e DINARELLO, C.A. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin-4: Interleukin-4 suppresses interleukin-1 production but up-

regulates gene expression and synthesis of interleukin-1 receptor antagonist.

**Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 89: 4076-4080, 1992.

VERRIL, P. Sympathetic ganglion lesions. In: **Textbook of Pain**, P.D. Wall and Melzack (Eds.), Churchill Livingstone, Edinburg, 1984.

WALTKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M.T. e MAIER, S.F. Mechanisms of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res.**, 692: 244-250, 1995.

WARNCKE, T.; STUBHAUG, A. e JORUM, E. Ketamine, and NMDA receptor antagonist, suppresses spatial and temporal properties of burn-induced secondary hyperalgesia In man: a double blind, crossover comparison with morphine and placebo. **Pain**, 72: 99-106, 1997.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; HALLIN, R.G. The influence of the sympathetic system on mechanoreception and nociception. **Human Neurobiol.**, 3: 41, 1984.

WILLIAMS, R.O.; FELDMANN, M. e MAINI, R.N. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 89: 9784-9788, 1992.

WONG, M.L.; RETTORI, V.; AL-SHEKHLEE, A.; BONGIORNO, P.B.; CANTEROS, G.; McCANN, S.M.; GOLD, P.W. e LICINIO, J. Inducible nitric oxide synthase gene expression In the brain during systemic Inflammation. **Nature Medicine**, 2: 581-584, 1996.

WOOLF, C.J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. e POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor  $\alpha$ . **Br. J. Pharmacol.**, 121: 417-424, 1997.

WOOLF, C.J. e SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, 288: 1765-1768, 2000.

ZURAWSKI, G. e VRIES, J.E. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. **Immunol. Today**, 15: 19-26, 1994.