

DANIELLA PEREIRA CROSARA ALBERTO

*BRADICININA INDUZ PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE
TUMORAL- α MEMBRANAR E SOLÚVEL POR MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c*

Dissertação submetida ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

ORIENTADOR: Fernando de Queiróz Cunha

Este trabalho é dedicado

Aos meus pais , pelo apoio constante em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido, pelo amor, apoio e companheirismo.

Ao Gustavo, meu filho, pela infinita alegria que nos tem dado.

Às minhas irmãs, mulheres batalhadoras que me apoiaram nos momentos difíceis.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho. Gostaria de agradecer de maneira especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela confiança e apoio depositados, contribuindo enormemente para minha maturidade científica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pesquisador completo e empreendedor, cuja convivência inspiradora tenho o privilégio de apreciar.

A todos os meus companheiros de laboratório, pela convivência descontraída que tornou meu dia-a-dia mais agradável. Agradeço particularmente à Simone, amiga que durante o desenvolvimento desse trabalho contribuiu com críticas e sugestões pertinentes.

Aos amigos Liu e à Lee pela simpatia e incansável disponibilidade.

À Márcia, pelos inestimáveis cuidados e carinho especial dispensados ao Gustavo.

Ao apoio técnico de Ieda, Serginho, Kátia, Diva, Eliana, D. Neusa, Fabíola e Issa.

À Fátima, Sonia e José Ramon pela colaboração durante a realização deste trabalho.

À Gilda, pela revisão gramatical do manuscrito.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

ACF: adjuvante completo de Freund

Arg: arginina

Gli: glicina

IFN: interferon

IL: interleucina

kD: quilo Dalton (s)

LPS: lipopolissacarídeo

NPC: *NOVA pharmaceutical corporation*

Phe: fenilalanina

PMA: acetato de forbol miristato

Pro: prolina

RNA: ácido ribonucleico

Ser: serina

Thi: tirosina

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

μ l: micro litro (s)

Introdução

1 - Bradicinina: um breve histórico	1
2 - Síntese e metabolismo das cininas..	2
3 - Receptores da BK..	4
3.1 - Receptor B ₁	5
3.2 - Receptor B ₂	7
4 - O envolvimento das cininas nos eventos fisiológicos e fisiopatológicos. .	9
5 - Bradicinina e a hiperalgesia inflamatória periférica.	9
6 - Fator de Necrose Tumoral- α	12
6.1 - Receptores de TNF- α	16
6.2 - Atividades biológicas do TNF- α membranar e solúvel.	18
7 - Citocinas e hiperalgesia inflamatória.	19
Objetivos.	23

Material e Métodos

1 - Animais.	24
2 - Meio de cultura RPMI 164 suplementado.	24
3 - Soluções.	24
4 - Drogas.	25
5 - Linhagem celular	26
6 - Adjuvante completo de Freund.	26
7 - Citocinas e anticorpo.	26
8 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos	27
9 - Estimulação <i>in vitro</i> dos macrófagos.	27
10 - Obtenção dos sobrendantes de macrófagos.	27
11 - Extração das membranas dos macrófagos.	28
12 - Ensaio biológico para detecção da atividade do TNF.	29
Análise estatística.	28

Resultados

1 - Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos.	31
2 - Cinética da produção de TNF- α por macrófagos estimulados com BK.	31
3 - Anticorpo policlonal anti-TNF- α inibe a atividade citotóxica do TNF- α liberados por macrófagos peritoneais.	32
Figura 1.	33
Figura 2	34
Figura 3.	35
4 - BK induz a expressão de TNF membranar e liberação de TNF	

solúvel somente em animais pré-expostos a um pré-estímulo com ACF. .	36
5 - O papel dos receptores B ₁ e B ₂ na expressão de TNF membranar e liberação de TNF solúvel por macrófagos estimulados com BK.	36
5.1 - Antagonista para receptor B ₂ da BK (HOE 140) bloqueia a expressão de TNF membranar, mas não interfere na liberação de TNF solúvel por macrófagos estimulados com BK.	36
5.2 - O antagonista para receptor B ₁ da BK, (des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK), não interfere na produção de TNF.	36
Figura 4.	38
Figura 5.	39
Figura 6.	40
5.3 - Efeito do agonista B ₁ , des-Arg ⁹ -BK, na produção de TNF por macrófagos de camundongos.	41
Figura 7.	42

Discussão

Apêndice 1

Figura 8.	49
Figura 9.	50
Figura 10.	51

Resumo	52
------------------	----

Summary.	53
------------------	----

Referências Bibliográficas	54
--------------------------------------	----

1 - Bradicinina: um breve histórico.

A descoberta do sistema de cininas e calicreínas começou em 1909, quando Abelous e Bardier detectaram a presença de uma substância hipotensora na urina de humanos normais, a qual foi denominada de urohipotensina. Entretanto, investigações do sistema de formação das cininas podem ser datadas desde 1926, quando Frey e colaboradores estudaram os efeitos da injeção intravenosa de extrato de pâncreas. Observou-se que a secreção pancreática e a urina de cães normotensos produziam queda na pressão arterial. Assumiu-se então que o princípio ativo encontrado na urina de humanos e no extrato de pâncreas de cães era o mesmo e foram então denominados de calicreína (do grego *kallikréas*, sinônimo de pâncreas). Mais tarde, quando o grupo de Werle em 1937 estudava os efeitos da calicreína sobre a contratilidade do íleo de cobaia, foi demonstrado que a calicreína não era responsável por esta atividade contrátil. Estes investigadores observaram ainda que a calicreína, quando era incubada com plasma, uma potente substância estimuladora de músculo liso era liberada. Sabia-se que esta substância não era um produto da quebra da calicreína, mas um produto da quebra de proteínas plasmáticas. O agente, o qual Werle e colaboradores propuseram ser um polipeptídeo, foi inicialmente denominado de *Darmkontrahirende Substanz* (substância contratora de músculo intestinal). Werle e Berek, em 1948, redenominaaram a substância contratora de músculo liso como calidina e sugeriram ser o calidinogênio a substância inativa precursora da calidina, presente no plasma. Foi também concluído por este grupo, neste mesmo trabalho, que a substância farmacologicamente ativa, a calidina, era liberada pela ação proteolítica de uma enzima, a calicreína (Sharma & Buchanan, 1994).

Independentemente deste grupo alemão, em 1948 uma amostra do veneno de *Bothrops jararaca* foi levado para o laboratório onde trabalhavam Maurício Rocha e Silva, Wilsom T. Beraldo, G. Rosenfeld entre outros, para ser testada sua atividade sobre diversos órgãos em animais experimentais. O veneno de *Bothrops jararaca* era injetado em cães, uma amostra deste sangue era aplicada em íleo de

cobaia, em banho de órgãos. Observava-se uma contração lenta do íleo. A possibilidade de esta nova substância ser acetilcolina ou histamina foi logo descartada, pois as preparações estavam atropinizadas e/ou tratadas com anti-histamínico. Este princípio ativo, após serem feitos estudos bioquímicos, foi então denominado de Bradicinina - **Kinin** (indicando movimento) e **Brady** (lento). Ainda neste trabalho os autores definiram a fração proteica do plasma ou soro precursora da bradicinina (o bradicininogênio). Mostraram que a bradicinina não induz contração somente em íleo e útero de cobaia, mas também em útero e intestino de rato e intestino de coelho, verificou-se que o íleo de cobaia era o mais sensível e o íleo de rato, o menos sensível. Um outro fenômeno observado foi a queda na pressão arterial, quando a BK era injetada intravenosamente em coelhos, cães e gatos (Beraldo, 1992).

Como a bradicinina e a calidina são formadas diante de condições similares e possuíam as mesmas ações farmacológicas, suspeitou-se que poderiam derivar de um mesmo substrato e estarem intimamente relacionadas. A purificação destas substâncias se deu 7 anos mais tarde confirmando as suspeitas. Em 1960 Elliot e colaboradores isolaram a bradicinina formada pela reação da tripsina com globulina (Elliot et al, 1960) e sua síntese se deu também em 1960 por Boissonas e colaboradores (Boissonas et al, 1960). Pouco tempo depois descobriu-se que a calidina é um decapeptídeo e a bradicinina, um nonapeptídeo, ambos de origem plasmáticas. O termo genérico usado para este grupo é cininas. Estas substâncias são membros de um grupo de polipeptídeos com estrutura química e propriedades farmacológicas semelhantes.

2 - Síntese e Metabolismo das Cininas.

A seqüência de aminoácidos da BK é: Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Calidina difere em sua estrutura da BK na lisina residual no terminal

amínico, por isto pode ser algumas vezes denominada lisil-BK. Os precursores da BK e calidina são denominados de cininogênios. Existem dois tipos de cininogênios: de alto peso molecular e o de baixo peso molecular, ambos sintetizados pelo fígado. Proteases altamente específicas que irão formar BK e calidina a partir do cininogênio são denominadas de calicreínas.

Assim como os cininogênios, há duas formas de calicreínas: calicreína plasmática e a calicreína tecidual que são enzimas distintas, ativadas também por mecanismos distintos. A pré-calicreína plasmática em sua forma inativa encontra-se ligada ao cininogênio de alto peso molecular na razão de 1:1, formando portanto um complexo de aproximadamente 88 kD (Mandel et al, 1976). Este complexo inativo, em contato com o Fator de Hageman, forma a calicreína plasmática. Esta calicreína plasmática agirá sobre o cininogênio de alto peso molecular, formando finalmente a BK. A calicreína tissular encontra-se distribuída em alguns tecidos como pâncreas, rins, glândulas salivares, intestino, tecido sinovial. Diferentemente da calicreína plasmática, a tecidual age sobre o cininogênio de alto e baixo peso molecular. A enzima responsável em transformar a pré-calicreína em calicreína tissular ainda não é conhecida (Sharma & Buchanan, 1994).

O cininogênio de alto peso molecular, quando clivado por calicreínas plasmáticas, formará BK e quando clivado por calicreínas teciduais originará calidina, diferentemente o cininogênio de baixo peso molecular é substrato somente para calicreína tecidual, o qual formará somente calidina (Jacobsen, 1966).

Uma vez formadas, as cininas possuem atividade efêmera, as enzimas catabolizadoras são cininase I e a cininase II. A cininase I é também denominada de arginina carboxi peptidase, que libera a Arg⁹ do terminal carboxílico da BK. No plasma a calidina é convertida em BK pela liberação da Lis¹, esta por sua vez é inativada pela carboxipeptidase. A cininase I quando se encontra no plasma é denominada de carboxipeptidase N e quando se encontra ligada a membrana

celular é denominada de carboxipeptidase M, ambas catalisam a mesma reação. A carboxipeptidase M pode ser encontrada na placenta, rins, pulmões de humanos, assim como artéria pulmonar e pulmões bovino (Erdös, 1990).

A cininase II pode também ser chamada de dipeptidil carboxipeptidase ou ainda enzima conversora de angiotensina (ECA), ela libera o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹, do terminal carboxílico da molécula de BK. Uma outra enzima capaz de quebrar a BK no mesmo peptídeo em que a cininase II o faz, é a endopeptidase 24.11 neutra (NEP) ou encefalinase. Esta é uma metaloendopeptidase, encontrada no cérebro, nas microvilosidades de células placentárias e intestinais. No sangue, ela se encontra na membrana de neutrófilos, onde pode quebrar peptídeos quimiotáticos e cininas, podendo afetar a quimiotaxia (Erdös, 1990).

3 - Receptores da Bradicinina

Uma vez formada, a bradicinina possui um receptor para traduzir seu efeito. Foi proposto a existência de pelo menos dois tipos de receptores para BK, denominados de B₁ e B₂. Estes receptores foram assim classificados com base na ordem de potência de seus agonistas. Para os receptores B₁ (demonstrado em aorta de coelho): [des-Arg⁹]-BK > [Tyr(Me)⁸]-BK > BK (Ver abaixo). Receptores B₂ demonstrado em diversos órgãos (veia jugular e artéria carótida de coelho, íleo de gato e útero de rato): [Tyr(Me)⁸]-BK > BK > [des-Arg⁹]-BK (Hall, 1992).

3.1 - Receptor B₁

O receptor B₁ ainda é pouco conhecido, pois freqüentemente ele não aparece em algumas preparações isoladas, tornando-se induzido após algumas

horas de experimentação. Somente com o desenvolvimento de agonistas e antagonistas para o receptor da BK é que possibilitou o estudo mais detalhado, tanto das ações, quanto de seus receptores propriamente dito. O estudo pioneiro que objetivava estudar qual o grupo químico da bradicinina que se ligava ao receptor e era capaz de efetuar uma ação mostrou que a retirada da arginina no terminal carboxílico, resultando na [des-Arg⁹]-BK, formava um agonista 6 vezes mais potente que a BK, quando testado em segmento vascular de aorta (anel de aorta) de coelho. Estes autores mostraram ainda que o agonista quando ensaiado em preparações como íleo de gato e útero de rato, preparações que possuem o receptor B₂, provocava um efeito 1000 e 100 vezes menor que a BK, respectivamente. Atualmente o agonista mais usado para estudos deste receptor é a [des-Arg⁹]-BK. Como sabemos, este peptídeo é produto da quebra da BK pela carboxipeptidase endógena, portanto ele pode ser um ligante natural para o receptor B₁.

Assim como os agonistas, os antagonistas também são importantes ferramentas no estudo de receptores. Mostrou-se que uma substituição na posição 8 do agonista B₁, [des-Arg⁹]-BK, mudava a potência deste peptídeo ao receptor, inseriu-se então uma leucina na posição 8 do agonista, formando então o (des-Arg⁹, [Leu⁸]-BK), antagonista B₁ e inativo em receptores B₂, amplamente utilizado. Outros antagonistas análogos da des-Arg⁹-BK, ou ainda antagonistas não peptídicos, vêm sendo desenvolvidos (Hall, 1992).

No que se refere a subtipos de receptor B₁, alguns estudos têm sido desenvolvidos para tentar demonstrar a existência de alguns subtipos para este receptor (Paiva, 1989; Wiemer & Wirth, 1992), mas estes dados não são suficientemente conclusivos e estudos adicionais mostram-se necessários.

Atualmente vários dados de literatura têm suportado a idéia de que o receptor B₁ pode ser modulado positivamente por diversos fatores, como por

exemplo fatores de crescimento, citocinas, LPS e PMA. Estas observações foram obtidas, em sua maioria, utilizando-se tanto modelos *in vivo*, quanto *in vitro*.

Resumidamente, o modelo *in vivo* consiste na injeção intravenosa em coelhos de uma dose subletal de LPS. Cinco horas após este tratamento, o agonista des-Arg⁹-BK ou lys-Arg⁹-BK são injetados por via intrarterial. Animais tratados com LPS exibiram uma resposta hipotensora ao tratamento intra-arterial do agonista B₁. Por outro lado, animais normais não apresentaram resposta hipotensora, quando tratados com o agonista B₁, mostrando que o LPS foi capaz de modular positivamente receptores B₁. Observações adicionais são apresentadas resumidamente: a- o tratamento com LPS não modifica a pressão arterial basal ou a resposta hipotensora da BK (mediada pelo receptor B₂); b- LPS administrado imediatamente após a injeção com o agonista não induziu resposta hipotensora, indicando a necessidade de um tempo mínimo para a síntese proteica; c- tecidos removidos de animais tratados com LPS exibem resposta contratora (segmento de anéis vasculares) na primeira hora de incubação *in vitro*, indicando que a resposta foi adquirida *in vivo* antes do sacrifício; d- o agonista apresenta resposta vasodilatadora em artérias coronárias somente quando provenientes de animais pré-tratados com LPS e perfundidos *in vitro*. Assim este modelo sugere que o sistema cardiovascular em coelhos pode ser sensibilizado a fragmentos de BK sem modificar a população de receptores B₂ (Marceau, 1995).

No modelo *in vitro*, anéis de aorta de coelhos normais são levados ao banho de órgão e a resposta contratora medida 1, 3 e 6 horas após. A modulação positiva em resposta ao des-Arg⁹-BK pode ser: a- observada após 3 e 6 horas de incubação no banho de órgãos; b- prevenida por inibidores da síntese de RNA e síntese proteica, mesmo quando ao banho de órgãos está adicionado citocinas; c- otimizada, quando LPS é aplicado *in vitro*; d- aumentada, quando na presença de IL-1 ou IL-2 no banho em que os órgãos se encontram; e- suprimida por baixas concentrações de glicocorticóide; f- amplificada em aorta de coelho pela oncostatina M (citocina derivada de macrófagos). O estudo com outras citocinas,

além da IL-1 e IL-2 não mostrou serem reguladores importantes. Uma hipótese para explicar este fenômeno é que o aparecimento de receptor B₁ é dependente da produção local de IL-1 por aorta de coelho. Substâncias como LPS, PMA, a própria IL-1 são fatores que estimulam a produção desta citocina e o glicocorticóide inibe a síntese da mesma. Esta hipótese do envolvimento da IL-1 no aparecimento de receptores B₁ é reforçado por alguns estudos que detectaram IL-1 no banho de órgão em ambiente estéril. Por outro lado, observou-se que algumas linhagens celulares não respondem ao des-Arg⁹-BK, esta constatação pode ser atribuída ao fato de que este sistema não se encaixa no modelo de injúria tecidual, ou ainda, devido ao tempo de cultura destas células, exista diferença na resposta para o agonista (Marceau, 1995).

3.2 - Receptor B₂

Algumas substituições na molécula de BK têm sido feitas para se desenvolver um novo agonista para receptor B₂ de BK, mas na maioria os compostos formados são menos potentes que a própria molécula de BK. Um composto em particular, [Tyr(Me)⁸]-BK, mostrou ser um agonista para este receptor, embora seja até mais potente que a própria BK e ser inativa no receptor B₁ (Hall, 1992).

Stewart classificou os antagonistas para este receptor em primeira e segunda geração de antagonistas. A primeira geração baseou-se na substituição da prolina na posição 7 por uma fenilalanina e até hoje esta substituição tem sido considerada essencial para todos os antagonistas B₂. Além desta modificação, outras foram feitas com o objetivo de se aumentar a afinidade e bloquear a ação de enzimas que rapidamente degradam a BK *in vivo*. A segunda geração deu início quando investigadores da Hoescht substituíram os resíduos na posição 7 e 8 por um resíduo hidrofóbico, resultando em D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-

D-Tic-Oic-Arg (HOE 140), que conferiu longa duração e potência à molécula, sendo um antagonista competitivo: Tic é ácido carboxílico tetrahidroisoquinilona e Oic é ácido octahidroindolecarboxílico. O Oci é o resíduo que confere resistência a carboxipeptidase N. Finalmente a próxima geração deve combinar antagonistas tanto para receptor B_1 quanto B_2 , pois só assim seria possível bloquear os efeitos da BK em situações como a inflamação crônica, onde este antagonista “duplo” bloquearia a ação da BK em receptores B_1 induzidos frente a mediadores liberados durante o processo inflamatório (Stewart, 1995a). Atualmente foi desenvolvido um antagonista B_2 competitivo e não peptídico testado em estudos de ligação, em células IMR-90. Sua denominação é WIN 64338 e mostrou-se eficaz em antagonizar o efeito contrator da BK em íleo de cobaia (Sawutz et al, 1994).

Atualmente alguns estudos (Hall, 1992; Burch & Kyle, 1992; Regoli et al, 1994) propõem a existência de subtipos de receptores B_2 para BK, baseados em dados obtidos através do uso de diferentes antagonistas e agonistas para receptor B_2 e testados em diferentes tecidos e animais experimentais. Propõem-se dois subtipos: B_{2-A} , e B_{2-B} . Segundo Regoli (Regoli et al, 1994) e colaboradores, ambos parecem ser espécie dependentes: B_{2-A} parecem estar presentes em coelhos, enquanto que o subtipo B_{2-B} aparece em cobaia. Por outro lado, Hall (Hall, 1994) em sua revisão propõe que ambos os subtipos de receptores coexistam em uma mesma espécie animal e ainda propõe que os subtipos do receptor B_2 são, na verdade, um novo receptor, o B_3 . Vários outros trabalhos, por sua vez, mostram ainda a existência outros subtipos como B_3 (Farmer et al., 1989, Farmer & DeSiato, 1994), B_4 e B_5 (Hall, 1994) para BK.

4 - O envolvimento das cininas em eventos fisiológicos e fisiopatológicos

Com a ligação da BK a seus receptores alguns efeitos fisiológicos e fisiopatológicos são observados. Como efeitos fisiológicos podem ser citados: no sistema gastrointestinal as cininas estão envolvidas na motilidade (Boohla et al, 1992) e transporte de íons (Cuthbert e Margolius, 1982); na excreção são importantes para a regulação da perfusão renal e excreção de sódio (Smits e col. 1990); na circulação a ação vasodilatadora das cininas é bastante conhecida (Boohla e col. 1992); no sistema nervoso as cininas periféricas são essenciais na sinalização da dor (Steranka et al., 1988). Finalmente, tem-se demonstrado que no cérebro alguns terminais nervosos possuem cininas, embora sua função não seja totalmente entendida (Boohla et al., 1992). Baseados em efeitos observados em diversos modelos experimentais sugere-se que a BK desempenha algum papel na fisiopatologias de algumas doenças como: dor, inflamação, edema, choque, rinite, asma, enxaqueca entre outros (Stewart, 1995b).

No que se refere à inflamação, a BK pode reproduzir ou evocar, sob muitas circunstâncias, todos os quatro sinais clássicos da inflamação (calor, rubor, tumor e dor). A produção de cininas é uma parte integrante e precoce na resposta dos tecidos à agentes desencadeadores da resposta inflamatória. Alguns destes agentes podem ser lesão tecidual, presença de bactérias ou antígenos estranhos. Assim, a liberação inicial das cininas pode induzir a formação e/ou liberação de todos os outros mediadores do processo inflamatório (Henson e Murphy, 1989).

5 - Bradicinina e a hiperalgisia inflamatória periférica.

Muitas das sensações que diariamente captamos não nos perturba, pois resultam de informações que recebemos do meio ambiente e na maioria das vezes são codificadas como neutras. Por outro lado, a sensação dolorosa não é uma sensação neutra, pois nos leva a conscientização dos sinais captados. Assim

dor é uma sensação desagradável e experiência emocional associada com lesão tecidual ou potencialmente injuriante. Um outro fenômeno associado a dor é a hiperalgesia inflamatória, que pode ser definida como uma resposta aumentada a um certo estímulo, que em situação normal não é nocivo. Esta resposta aumentada é causada pela liberação de mediadores inflamatórios produzidos no local do tecido injuriado e que irão sensibilizar as fibras que levam as informações dolorosas ao sistema nervoso central. As terminações nervosas livres dos neurônios primários responsáveis por captar e transmitir a informação nociceptiva desde a periferia até o sistema nervoso central são denominadas nociceptores. Eles são encontrados em tecidos subcutâneos, músculos, articulações e vísceras (Bonica, 1990).

Os mediadores da dor inflamatória, que irão agir sobre os nociceptores, podem ser divididos em duas classes: ativadores diretos, como por exemplo a BK e histamina; e os que causam sensibilização hiperalgésica como por exemplo as prostaglandinas (Ferreira et al., 1991). No caso da hiperalgesia, ela possui dois componentes: um mediado pelos metabólitos do ácido aracdônico e outro mediado por aminas simpatomiméticas.

A BK é capaz de causar dor e hiperalgesia (Steranka et al., 1988). Um dos trabalhos que mostram estes dois efeitos da BK foi realizado por Steranka e col. Para isto ratos foram canulados através da carótida direita e a partir daí foi administrada BK e seus antagonistas. Respostas comportamentais do animal foram interpretadas como uma resposta de dor. Estas respostas consistem na torção da cabeça do animal para o lado direito e ainda a flexão da pata direita. Quando estes animais eram tratados com BK (2nmol/kg) por via intra-arterial, 100% dos animais apresentavam torção da cabeça para o lado direito e a flexão da pata direita. Este efeito da BK foi bloqueado com antagonistas para receptores B_2 da BK, como NPC 414, NPC 566 e NPC 722. Estes dados mostram o efeito algésico da BK mediado por receptores B_2 , já que os antagonistas B_2 usados bloquearam a resposta comportamental dos animais. Para a análise do efeito

hiperalgésico da BK utilizou-se o modelo de Randall-Sellito. A BK (2nmol) foi injetada intradermicamente no dorso da pata do animal e os antagonistas eram co-injetados pela mesma via. A pata era então submetida à pressão variável no local da injeção. Era observado o limiar da retirada da pata, frente ao estímulo mecânico. Assim após o tratamento com BK, observou-se um menor tempo para que o animal retirasse a pata frente ao estímulo mecânico, quando este tempo foi comparado com patas tratadas somente com salina. Por outro lado em animais tratados com BK e co-injetados com os antagonistas B_2 , foi observado maior tempo de estímulo mecânico, quando comparado com patas tratadas somente com BK. Estes dados mostram que a BK também apresenta um efeito hiperalgésico e é mediado por receptor B_2 . Além de se demonstrar que a BK aplicada exogenamente apresenta efeito hiperalgésico, foi testado o efeito da BK produzida endogenamente. Para isto no dorso das patas dos animais foram injetados com cristais de urato, por via intradérmica, 4 horas mais tarde as patas receberam antagonistas da BK pela mesma via. O tempo para a retirada da pata tratada com cristais de urato, frente ao estímulo mecânico, foi menor do que as patas que não foram tratadas com cristais de urato. Os animais que receberam cristais de urato e 4 horas mais tarde foram tratados com antagonista B_2 de BK suportaram um tempo maior frente ao estímulo mecânico. Assim, os dados em conjunto mostraram que a BK possui efeito algésico e hiperalgésico, ambos mediado pelo receptor B_2 da BK. Tanto a BK produzida endogenamente, quanto a BK aplicada exogenamente possuem um efeito hiperalgésico. Além disto a perfusão de cobaias com [3 H] BK e posterior auto-radiografia identificou sítios de ligação para a BK nas vias neuronais relacionadas com a nocicepção. Desta maneira, ficou demonstrado o efeito algésico e hiperalgésico da BK e além disto foi identificado receptores de BK no local de sua ação (Steranka et al, 1988).

Estudos subsequentes mostraram que além do receptor B_2 , o receptor B_1 também medeia hiperalgesia em animais que receberam estímulo lesivo. Neste sentido, a região plantar de ratos foram expostas à radiação ultra-violeta como

estímulo lesivo. A hiperalgesia foi medida pelo tempo em que os animais permitiam a exposição das patas frente a estímulo térmico. Em animais não irradiados o agonista B_1 , des-Arg⁹-BK, e a própria BK foram administrados por via intraplantar e não modificaram o tempo de retirada da pata frente ao estímulo térmico. Por outro lado, animais que receberam a irradiação prévia de raios ultra-violeta mostraram um tempo menor para a retirada da pata, quando foram pré-tratados com BK e o agonista B_1 . O pré-tratamento de animais irradiados com antagonista B_1 , des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK aumentou o tempo de retirada da pata frente ao estímulo de calor. Este efeito não foi observado, quando o animal irradiado foi pré-tratado com antagonista B_2 , HOE 140. Estes resultados sugerem que no processo inflamatório desencadeado pela irradiação plantar dos animais, o receptor B_1 é modulado positivamente e está envolvido na hiperalgesia, enquanto que, neste modelo o receptor B_2 não desempenha nenhum papel (Perkins & Kelly, 1993).

Um conjunto de dados discutidos por Dray e Perkins em sua revisão mostrou que o mecanismo hiperalgésico da BK foi atribuído à liberação de mediadores hiperalgésicos como prostaglandinas e citocinas induzidos pela BK (Dray & Perkins, 1993).

6 - Fator de Necrose Tumoral - α .

TNF- α também denominado de caquexina, é uma citocina produzida principalmente por macrófagos ativados, foi originalmente identificada como uma proteína com efeito tumoricida, envolvida na necrose hemorrágica de tumores sólidos transplantados em camundongos (Carswell et al., 1985). Atualmente sabe-se que o TNF- α está envolvido em muitos processos como inflamação e imunoregulação, na defesa antiviral, choque endotóxico, caquexia, angiogênese e mitogênese (Agarwal & Pocsik, 1992).

O TNF- α é um dos dez membros da família, cujos integrantes ativam receptores relacionados estruturalmente. Os membros desta família são TNF- α , linfotóxina α e β , Fas, fator de crescimento de nervos, CD40, CD27, CD30, OX-40 e 4-1BB. O termo "CD" (*cluster of differentiation*) refere-se a antígenos de superfície celular, característicos de uma determinada linhagem celular ou estágio de diferenciação e reconhecidas por anticorpos monoclonais. Este tipo de marcação permitiu a identificação das células que participam nos diferentes processos, seu estado de ativação e função efetora. O antígeno Fas pode também ser conhecido como CD 95, é expresso por diferentes tipos celulares e está envolvido na morte programada de células. O CD40 é expresso principalmente por células B, desempenhando um papel na ativação de células B pelo contato com células T. Estudos indicam que o CD27 está envolvido no crescimento de células B, são expressos por células T e talvez também por algumas células do plasma. Não se sabe a função do CD30, mas é conhecido que ele é expresso por células T e B. Finalmente os dois antígenos menos conhecidos são o OX-40 e o 4-1BB. O 4-1BB é expresso por células T e macrófagos ativados, células placentárias, renais, pulmonares e do músculo liso, quanto a sua função biológica parece desempenhar um papel co-estimulatório na ativação de células T. O OX-40 também parece desempenhar um papel co-estimulatório na ativação de células T e ainda na liberação de citocinas durante a resposta imune (Gruss & Dower, 1995).

Estruturalmente, os membros da família do TNF consistem de três cadeias idênticas de polipeptídeos, são proteínas transmembrânicas, efetuam uma resposta quando em contato célula-célula e se ligam a somente um tipo de receptor. As grandes exceções desta família do TNF são o TNF- α e a linfotóxina (também denominada de linfotóxina- α ou TNF- β). A linfotóxina é uma molécula secretada na forma de um homotrímero, enquanto que os demais membros da família do TNF são proteínas transmembrânicas. Por outro lado a linfotóxina- α também se encontra ligada à membrana plasmática através de uma proteína de

membrana de 33 kDa, denominada de linfotoxina β , o que vem de acordo com os demais membros desta família. O TNF- α também pode ser uma molécula secretada ou uma molécula transmembrânica (ver abaixo). Outra exceção que se refere à linfotoxina e ao TNF- α é que eles se ligam a dois tipos de receptores distintos (Bazzoni & Beutler, 1996).

O TNF- α é uma molécula composta por três monômeros idênticos de peso molecular de 17kDa cada, que irão formar um trímero em forma de cone ou sino (Jones et al., 1989; Eck et al 1988). A molécula precursora do TNF- α é inicialmente expressa como uma molécula de 26kDa, ancorada à membrana celular e após ser quebrada por enzimas dará origem a forma madura de 17KDa. Gearing e colaboradores mostraram que a quebra da molécula de TNF- α de 26kDa para formar o TNF α solúvel se dá por uma enzima semelhante a uma metaloproteinase. Esta observação foi demonstrada em leucócitos em cultura, onde a quebra do TNF de 26kDa é impedida por inibidores de metaloproteinase. Para reforçar estes dados, em estudos *in vivo*, observa-se que inibidores de metaloproteinase, quando pré-injetados em ratos e posteriormente tratados com endotoxina, impediu a liberação de TNF- α na sua forma solúvel (Gearing et al, 1994).

Vários trabalhos, utilizando métodos experimentais distintos, demonstraram que o TNF pode apresentar-se ancorado á membrana plasmática (Chensue et al, 1988) de diferentes tipos celulares como células de Kupfer, macrófagos esplênicos, alveolares e peritoniais (Decker et al, 1987). Além disto mostraram também que o TNF membranar exerce atividade citotóxica. Para isto as diferentes populações de macrófagos foram estimuladas com LPS, IFN- γ ou tioglicolato. Após a estimulação destas células, elas foram fixadas e ensaiadas sobre linhagens celulares sensíveis ao TNF (WEHI 164 e L929). Observou-se que os macrófagos fixados de diferentes populações são capazes de lisar tanto a WEHI 164, quanto L929 e o anticorpo monoclonal anti-TNF impediu a ação citotóxica do TNF membranar dos macrófagos. Estes dados indicam que o TNF

está preso à membrana plasmática e exerce atividade citotóxica (Decker et al, 1987, Kriegler et al, 1988). Ficou demonstrado então que o TNF de 26 kDa é uma molécula transmembranar e é precursora do TNF solúvel de 17kDa, ambos tipos de TNF possuem atividade citotóxica.

Além do TNF membranar de 26kDa, foi demonstrado que o TNF de 17 kDa pode também estar preso à membrana plasmática e exercer atividade citotóxica. Luettig e Barouche extraíram as membranas de células ativadas e as ensaiaram sobre células sensíveis ao TNF, mostrando que elas exercem atividade citotóxica, mas a análise do peso molecular do TNF preso à estas membranas mostrou que o TNF em estudo tem o peso molecular de 17kDa. Quando as membranas extraídas dos macrófagos ativados foram submetidas ao tratamento com soluções de baixo pH ou soluções com alta concentração de sais, observou-se que a atividade citotóxica destas membranas, após estes tratamentos, diminui, e que a incubação destas membranas com TNF recombinante restabeleceu a atividade citotóxica das membranas. Demonstrou-se então que o TNF de 17kDa também pode estar ligado à membrana plasmática. Foi então sugerido que o TNF pode estar preso à membrana através, ou de uma proteína de ancoragem, ou de um “receptor irresposivo” ao TNF a ele ligado. Este fenômeno foi observado somente em macrófagos ativados. Foi proposto então que macrófagos ativados podem aumentar o número deste “receptor irresposivo” em que o TNF de 17kDa se liga, ou ainda aumentar a afinidade do TNF a este “receptor”. Além disto mostrou-se que o TNF ligado ao “receptor” tem atividade citotóxica sobre células L929 (Barouche, 1988; Luettig, 1989). Dados adicionais para este receptor como: peso molecular, a existência ou não deste receptor na sua forma solúvel etc.. não foram encontrados em literatura.

Sugere-se então que o TNF- α pode se apresentar de duas maneiras: solúvel, com peso molecular de 17kDa, ou associado à membrana plasmática, apresentando peso molecular de 26kDa. O TNF de 17kDa, além de sua forma

solúvel, pode estar ligado a um “receptor irresponsivo”, ser expresso somente em células ativadas e apresentar também atividade citotóxica.

6.1 - Receptores de TNF- α

Assim como o TNF- α pertence a uma família de ligantes, os receptores para TNF α também pertencem a esta família. Acredita-se que todos os membros desta família de receptores são proteínas transmembrânicas que consistem de duas subunidades idênticas. Esta família é definida por uma região rica de aminoácido cisteína, que recorre ao meio extracelular de três a cinco vezes e o domínio intracitoplasmático é mais extenso do que o extracelular. Alguns membros desta família de receptores possuem uma sequência intracelular de 60 resíduos, denominados de domínio morto (Beutler & van-Huffel, 1994; Bazzoni & Beutler, 1996).

A vasta gama de efeitos biológicos do TNF- α pode ser explicada pela presença de receptores para TNF em quase todos os tipos de células nucleadas. Atualmente se conhecem dois tipos de receptores para TNF- α , um deles é denominado de p55, TNF-R55, TNFR1, TNFR β ou ainda CD120a com peso molecular de 55KDa; o outro receptor possui peso molecular de 75kDa e pode ser denominado de p75, TNF-R75, TNFR2, TNFR- α ou ainda CD120b (Vandenabeele et al, 1995). Nesta dissertação os dois tipos de receptores serão referidos como p55 e p75.

Existem diferenças em relação a regulação dos genes que irão expressar estes receptores, experimentos realizados em células B e T, macrófagos e células epiteliais de linhagem mostraram que o gene para o receptor p55 não é induzido por fatores exógenos como mitógenos, LPS ou IL-2, indicando que este gene é controlado por um promotor não induzível. Por outro lado, estes mesmos tipos celulares e mesmos fatores exógenos foram capazes de induzir a expressão do gene para o receptor p75. A grande variabilidade no número de receptores p75 e

p55 pode ser atribuído aos inúmeros fatores externos que regulam a expressão para o receptor p75 (Vandenabeele et al, 1995).

Atualmente a função específica para cada um dos receptores permanece obscura. Anticorpos para o receptor p55 e p75 são capazes de inibir parcialmente a atividade citotóxica em células tumorais e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, sugerindo que ambos os receptores exercem as mesmas funções. Entretanto estudos de ligação do TNF- α a seus receptores mostraram diferença na cinética de associação e dissociação a cada um destes receptores, foi proposto então o modelo da “passagem do ligante”. Este modelo propõe que o TNF α em baixas concentrações se liga preferencialmente ao receptor p75, já que dados anteriores mostraram que a molécula de TNF α tem maior afinidade ao receptor p75, após a ligação da molécula a este receptor, ela é levada até os receptores p55 vizinhos ao receptor p75 ocupado. A passagem do ligante pelo receptor p75 explica o fato de que o TNF- α em baixas concentrações é capaz de exercer sua atividade pró-inflamatória (Vandenabeele et al, 1995; Tartaglia & Goeddel, 1992; Bazzoni & Beutler, 1996).

Uma outra característica dos receptores para TNF é a presença de formas solúveis do receptor p75 e p55. Esta forma solúvel para cada um dos receptores foi inicialmente identificada no plasma e na urina de pacientes com cancer. Nophar et al. observaram formas solúveis do receptor p55 em células infectadas com o cDNA para o receptor de TNF p55. Estes dados sugerem que o mesmo gene é responsável pela transcrição tanto do receptor solúvel quanto para a forma membranar. Assim a célula deve possuir mecanismos que permitam a liberação do receptor membranar, transformando-o em solúvel. Com a liberação do receptor pode haver supressão da resposta ao TNF, tanto na célula que libera o receptor solúvel, quanto na célula alvo, pois as células que liberam o receptor solúvel possuirão menos receptores intactos, conseqüentemente passarão a responder menos ao TNF. Nas células alvo o receptor liberado se ligará ao TNF

solúvel, inativando-o. Sugere-se então que os receptores solúveis para TNF possam desempenhar um mecanismo de regulação do TNF (Nophar et al, 1990).

6.2 - Atividades biológicas do TNF- α solúvel e membranar.

Atualmente começou a se definir quais as atividades biológicas que cada tipo de TNF- α , solúvel e membranar, podem exercer. Lopez-Cepero et al. para demonstrarem que o TNF membranar exerce atividade citotóxica, procederam da seguinte maneira: células B procedentes de camundongos portadores de tumor foram coincubadas com células de linhagem sensíveis ao TNF (WEHI 164 e L929). Observou-se lise das células alvo quando em contato com células B de animais portadores de tumor, confirmado com o anticorpo anti-TNF, que inibiu a atividade citotóxica. Esta atividade citotóxica não foi observada em células B provenientes de animais normais. Demonstraram então que o TNF membranar está envolvido no mecanismo citotóxico exercido por células B (Lopez-Cepero et al, 1994).

Além da atividade citotóxica do TNF membranar, sugere-se que ele exerça esta atividade no local. Karp et al (1992) analisou-se a capacidade de uma linhagem de fibrossarcoma murino, geneticamente modificada para expressão de TNF membranar, em induzir resposta do hospedeiro contra seu próprio desenvolvimento, para isto foi analisado a cinética do crescimento do tumor. Demonstraram que as células capazes de produzir somente o TNF membranar não evocou resposta do hospedeiro contra o crescimento deste tumor. Em contrapartida, a mesma linhagem tumoral geneticamente modificada para produzir TNF solúvel sofreu regressão tumoral em 28 dias, efeito que foi abolido com o tratamento com anticorpo anti-TNF. Assim, sugeriu-se que o TNF- α membranar desempenha uma atividade local, enquanto que o solúvel induz uma resposta sistêmica.

Alguns trabalhos têm mostrado que TNF- α membranar e solúvel tem afinidades diferentes pelos dois receptores para TNF. Grell et al. demonstraram que o TNF- α membranar é superior ao solúvel em ativar o receptor p75 para efetuarem respostas como a ativação de células T, proliferação de timócitos, produção do fator estimulador de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Grell et al., 1995). Dados adicionais a este respeito foram obtidos por Decoster e colaboradores. Células L929 foram construídas para expressarem somente o TNF membranar ou ainda expressam o TNF membranar e solúvel. Alguns resultados mostraram que, tanto a linhagem celular que expressa somente TNF membranar, quanto a linhagem que produz TNF membranar e solúvel, são capazes de efetuar igualmente respostas como proliferação celular e produção de GM-CSF. Por outro lado, diferenças na ativação dos receptores pelos dois tipos de TNF foram observadas. Na apoptose o TNF membranar foi menos efetivo do que o TNF solúvel. É sabido que a apoptose é mediada pelo receptor p55 e o TNF, em baixas concentrações, pode facilitar a apoptose através da passagem do ligante do receptor p75 para o p55. Foi sugerido então que a menor efetividade do TNF membranar em induzir apoptose pode ser explicado pelo fato do TNF membranar não poder ser passado do receptor p75 para o p55 (Decoster et al. 1995).

7 - Citocinas e hiperalgisia inflamatória

Atualmente muitos trabalhos têm mostrado a participação de citocinas na hiperalgisia inflamatória através do uso de diferentes modelos experimentais.

Em 1988 Ferreira e colaboradores mostraram a participação da IL-1 na hiperalgisia. A injeção intraplantar de IL-1 em ratos desencadeou a hiperalgisia, quando foi utilizado o método de Randall-Selitto modificado, sendo que tal efeito hiperalgésico é antagonizado pelo tripeptídeo análogo a IL-1 (Ferreira et al, 1988). Ainda neste trabalho, mostrou-se o envolvimento das prostaglandinas,

através do pré-tratamento dos animais com indometacina. Começa então uma série de estudos que irão mostrar como as interleucinas participam na hiperalgesia inflamatória.

Em 1991, Cunha e colaboradores, através do tratamento intra-plantar de ratos e medida a hiperalgesia através do método de Randall-Selitto modificado, mostraram que a IL-8 também possui um efeito hiperalgésico. Além disto o pré-tratamento dos animais com guanetidina, atenolol e propranolol inibia a hiperalgesia induzida pela IL-8, mostrando que a hiperalgesia induzida pela IL-8 envolve aminas simpatomiméticas (Cunha et al. 1991). Uma das propriedades das citocinas é sua capacidade de induzir sua própria liberação ou ainda a liberação de outras citocinas (ver tópico citocinas). Em 1992, Cunha e colaboradores mostraram que o TNF e IL-6 são também hiperalgésicas. Além disto a hiperalgesia induzida pela IL-6 foi bloqueada pelo pré-tratamento dos animais com indometacina. O pré-tratamento intra-plantar em ratos com anticorpo anti-TNF aboliu totalmente o efeito hiperalgésico da carragenina, mostrando que o TNF desempenha um papel precoce e crucial no desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela carragenina. Demonstrou-se então a seguinte sequência de eventos: TNF induz a liberação IL-1, IL-6 e IL-8. A IL-6 e a IL-1 induzem a liberação de produtos da ciclooxigenase desencadeando o componente prostaglandínico da dor e a IL-8 ativa a via simpática da hiperalgesia inflamatória através da indução da liberação de aminas simpatomiméticas (Cunha et al, 1992).

Começa ficar claro que a liberação de mediadores como prostaglandinas é posterior á liberação de citocinas e que o TNF parece ser a primeira citocina a ser liberada. Em 1993 foi demonstrado utilizando-se também o modelo de Randall-Selitto modificado, que a BK, além de ser um mediador direto da hiperalgesia, ela é capaz de induzir a liberação de TNF, pois quando ratos eram pré-tratados com anticorpo anti-TNF e seguidos de tratamento com a BK, houve abolição total do efeito hiperalgésico da BK (Ferreira, 1993). Propôs-se então que

após o estímulo injuriante há a produção e liberação de BK , por sua vez, a BK induz a liberação de TNF e este induz a liberação de outras citocinas e mediadores que participam da hiperalgesia inflamatória.

Outros laboratórios também mostraram o envolvimento de citocinas na hiperalgesia. Watkins et al mostraram que o TNF- α possui efeito hiperalgésico quando administrado por via intraperitoneal. O método utilizado para avaliar a hiperalgesia foi o teste de retirada de cauda, através do qual é analisado o limiar para a retirada da cauda frente ao estímulo térmico. A administração intraperitoneal de TNF- α reduziu a latência para a retirada da cauda, mostrando o efeito hiperalgésico do TNF- α . Além disto a administração de antagonista para o receptor de IL-1 β bloqueou a hiperalgesia induzida pelo TNF, demonstrando que a hiperalgesia provocada pelo TNF é devido a liberação de IL-1 β (Watkins et al, 1995)

Além dos dados de nosso laboratório que sugerem que a BK induz liberação de citocinas como a IL-1, IL-6 IL-8 e TNF que irão participar do processo hiperalgésico, outros dados de literatura têm demonstrado que a BK também induz a liberação de citocinas em outros modelos experimentais. O estudo pioneiro que mostra a relação entre BK e citocinas foi realizado por Tiffany e Burch. Duas linhagens macrofágicas foram incubadas com BK e no seu sobrenadante as citocinas foram quantificadas. Foi demonstrado que as duas linhagens macrofágicas (P388-D1, RAW 264.7) foram capazes de liberar TNF e IL-1, quando estas células eram incubadas com BK. A incubação dos macrófagos com antagonista B₁ para o receptor da BK impediu a liberação de TNF para o sobrenadante, sugerindo que na liberação de TNF pelas linhagens macrofágicas e estimuladas com BK, o receptor B₁ está envolvido (Tiffany & Burch, 1989).

Mais recentemente, outro dado de literatura mostrou que a BK é capaz de liberar outras citocinas, além do TNF. Seguintes de pulmão de cobaia, camundongos e alguns pacientes com câncer foram colocadas em banho de

órgãos. Os seguimentos de pulmão foram contraídos com BK em diferentes concentrações e as citocinas liberadas no banho foram quantificadas. Observou-se a liberação de IL-1, IL-2 e IL-6 em diferentes concentrações e ainda receptores solúveis para IL-2 e traços de receptores solúveis de IL-3. Estes dados indicam que este tecido quando estimulado com BK também libera citocinas (Paegelow et al, 1995). Por outro lado não foi observado a liberação de TNF para o banho de órgãos. Este fato vem reforçar os objetivos deste trabalho, o qual se propõe a verificar se a BK é capaz de induzir a liberação de TNF.

Como foi exposto anteriormente dados de nosso laboratório sugerem que a BK induz a liberação de citocinas como, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, que participam da hiperalgesia, demonstrados no modelo *in vivo*. Além disto a BK também induz a liberação de citocinas em segmentos de pulmão e linhagens macrofágicas. Estes dados sugerem a capacidade da BK em induzir a liberação de diversas citocinas.

Assim este trabalho propõe basicamente:

- 1 - demonstrar que a BK induz liberação *in vitro* de TNF- α por macrófagos,
- 2 - mostrar quais os tipos de TNF- α que são induzidos pela BK.
- 3 - estudar os tipos de receptores de BK que estão envolvidos na indução do TNF- α .

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, com peso entre 20 - 30 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto e mantidos em sala com temperatura controlada entre 23 - 25 °C, com livre acesso a água e ração

2- Meio de cultura RPMI 1640 suplementado:

RPMI 1640	10,40 g (Sigma)
Bicarbonato de Sódio	2,2 g (Reagen)
Antibióticos	(100U/ml de Penicilina e 100 µg/ml de Estreptomicina)
Soro Bovino Fetal	10% de SBF (Sigma)
Água desionizada q.s.p.	1000 ml

O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 6 N e o meio foi esterilizado por filtro de miliporo de 0,22 µM antes do uso.

3 - Soluções.

3.1- Solução de Turk

Ácido acético glacial	20,0 ml (Merck)
Azul de Metileno	0,5 g (Merck)
Água destilada	1000 ml

3.2- Solução de Lipopolissacarídeo (LPS)

Lipopolisacarídeo purificado de *Escherichia coli* (Difco) foi estocado em freezer -70°C , na concentração de 1 mg/ml, diluído em PBS. Antes do uso a solução era submetida à sonicação por 5 min.

3.3 - MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromide) (Sigma).

Solução estoque era de 5 mg/ml diluída em PBS, esterilizada em filtro de miliporo $0,22\ \mu\text{M}$, mantida em geladeira ao abrigo da luz

4 - Drogas

Todas as drogas utilizadas neste trabalho foram preparadas imediatamente antes do uso, com exceção da Bradicinina (BK).

4.1- Bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (Sigma).

Solução estoque desta droga foi preparada em solução ácida de HCl 30mM, 1,00 mg/ml, aliquotadas em eppendorfs e mantidas em freezer -70°C . No momento do uso esta solução era diluída em RPMI sem SBF.

4.2- antagonista B_1 (des-Arg⁹, [Leu⁸]-Bradicinina) (Sigma).

Diluída em RPMI sem SBF, ao abrigo da luz.

4.3- antagonista B_2 : HOE 140 (Hoechst)

Diluída em RPMI sem SBF, ao abrigo da luz.

4.4- Agonista B_1 (des-Arg⁹-Bradicinina).

Diluída em RPMI sem SBF, ao abrigo da luz

4.5 - Captopril (Sigma).

Diluído em RPMI

5 - Linhagem celular

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi **WEHI 164, clone 13**, cedida pela Gennentech.

6 - Adjuvante Completo de Freund (Sigma).

Mantido em geladeira, ao abrigo da luz. Antes da injeção nos animais (0,3ml/ peritoneo) a suspensão era homogeneizada por pelo menos 5 minutos

7 - Citocinas e anticorpo

7.1- TNF: TNF- α recombinante murino, cód. 87/640, obtido de NIBISC . Cada ampola continha 150.000 UI/ μ g de proteína.

7.2 - IFN: IFN γ recombinante murino, obtido da NIBISC. Cada ampola continha 3×10^5 UI/ml.

7.3 - Anticorpo policlonal anti-TNF- α : gentilmente cedido por Dr. Eddie Liew, Universidade de Glasgow, Reino Unido.

8 - Obtenção de Macrófagos Peritoneais de camundongos.

Os animais eram tratados com adjuvante completo de Freund (ACF), 0,3ml, administrados intraperitonealmente (i.p.). Este tratamento era feito somente uma vez e após 14 dias os animais eram sacrificados em câmaras de éter. O peritônio destes animais era lavado com 5 ml de RPMI estéril. Todos os lavados peritoniais eram agrupados e centrifugados a 300 g, por 5 minutos, por pelo menos duas vezes e ressuspensos em RPMI completo.

Para a contagem total das células prosseguiu-se da seguinte maneira: 20 μ l de amostra celular foi diluída em 380 μ l da solução de Turk e contadas em câmaras de Neubauer. Diluições necessárias eram feitas para que se obtivesse 10^7 células/ ml/ poço e colocava-se estas células em placas de 6 poços.

As células eram incubadas em estufa de com 5% de CO₂, à temperatura de 37 °C por um período de 18 horas. Na primeira hora de incubação as células eram lavadas com RPMI completo e nova lavagem era realizada uma hora antes da incubação com as drogas.

9 - Estimulação *in vitro* dos Macrófagos

A monocamada de macrófagos previamente lavada era incubada por 30 minutos com:

a - meio RPMI sem soro bovino fetal (controle);

b - antagonista para receptor B₁ da bradicinina, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, nas concentrações de 6, 24 e 48 μM;

c - antagonista para receptor B₂ da bradicinina, HOE 140, nas concentrações de 6, 24 e 48 μM.

Subseqüentemente, as células provenientes dos diferentes tratamentos eram incubadas por 4 h com:

d - Bradicinina (3 μM) e captopril (1 μM);

e - LPS (20 ng/ml) e IFN γ (100 U/ml)

f - agonista para receptor B₁ da BK, des-Arg⁹-BK, nas concentrações de 1,3 e 9 μM.

Após este procedimento os sobrenadantes e as membranas eram preparados para quantificação do TNF solúvel e do TNF associado à membrana dos macrófagos.

10 - Obtenção dos Sobrenadantes de Macrófagos

Os sobrenadantes dos macrófagos eram centrifugados a 300 g, por 5 minutos para se obter uma amostra livre de células, transferidos para eppendorfs e estocados em freezer - 70°C até o momento do ensaio de bioatividade.

11 - Extração das Membranas dos Macrófagos

A extração das membranas baseou-se em Bakouche et al (Bakouche et al, 1988). Aos poços livres de seus sobrenadantes e lavados com PBS foi

acrescentado 500 µl de água gelada para lisar as células, seguido da retirada dos macrófagos aderentes com utensílio próprio (*cell scraper*). Este procedimento era repetido por mais duas vezes para que se pudesse retirar o maior número de células possíveis. O lisado era incubado por uma hora em banho de gelo e a cada 15 minutos submetia-os a vigorosas agitações durante 1 minuto. Logo após este período as amostras eram centrifugadas a 800 g por 5 minutos e desprezava-se o material sedimentado. O sobrenadante era novamente submetido a centrifugação com 17.000 g, por 40 min. Este material era então ressuspenso em 800 µl de RPMI completo e estocado em freezer - 70 °C até o momento do ensaio de bioatividade.

12 - Ensaio Biológico para Detecção da Atividade do TNF.

A atividade de TNF foi medida através do ensaio de citotoxicidade sobre as células sensíveis ao TNF, WEHI 164, clone 13, conforme descrição de Espervik & Nissen Mayer (1986). As células foram cultivadas em meio RPMI completo. Para o ensaio, inicialmente, as células WEHI foram colocadas em placas de 96 poços, numa concentração 2×10^4 células/poço em um volume de 50 µl/poço. As amostras a serem testadas (50 µl) foram adicionadas aos poços e incubadas durante 20h a 37° C em estufa de CO₂. Após este período, 10 µl de MTT, numa concentração de 5 mg/ml em PBS foi adicionado a cada poço e as placas deixadas em incubação por mais 4 h. A seguir 100 µl de isopropanol com 0,04 N HCl foi adicionado a cada poço, logo após dissolução completa dos cristais de formazan, as placas foram lidas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm

O percentual de células mortas foi determinado da seguinte forma:

$$\% \text{ células mortas} = 100 - \frac{\text{densidade óptica dos poços em amostra}}{\text{densidade óptica dos poços controle}} \times 100$$

Nos ensaios que foram usados soros anti-TNF foi colocado 50 μ l de suspensão celular, 40 μ l de amostra e 10 μ l de soro.

TNF recombinante murino utilizado como padrão tem atividade específica de 7×10^7 U/mg de proteína segundo dados do fabricante. Este TNF foi usado em várias concentrações em cada ensaio, com base nos quais calculávamos a atividade do TNF presente na membrana e no sobrenadante dos macrófagos em termos de ng/ml.

Os dados da figura 3 (ver resultados) nos mostraram que anticorpo anti-TNF- α bloqueou a atividade citotóxica das membranas e do sobrenadante de macrófagos incubados com BK e LPS associado ao IFN- γ , demonstrando que esta atividade citotóxica trata-se, pelo menos em parte, de TNF- α . Desta maneira os resultados deste trabalho obtidos através da atividade citotóxica observada nas membranas e sobrenadante serão referidos como TNF- α membranar e solúvel.

13 - Análise Estatística.

Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste de correção de Bonferoni. Estabeleceu-se o nível de significância em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1 - Produção do Fator de Necrose Tumoral por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com bradicinina

Para se estudar a capacidade da bradicinina em induzir a expressão de TNF- α membranar e TNF- α solúvel por macrófagos de camundongos tratados com adjuvante completo de Freund (ACF), diferentes concentrações de BK (0,006-6 μ M) na presença de captopril (1 μ M) foram adicionadas aos macrófagos. Observou-se que a bradicinina induz tanto a expressão de TNF membranar quanto a liberação de TNF solúvel, ambos dose dependente (figura 1). A partir da concentração de 0,5 μ M de bradicinina a liberação de ambos os tipos de TNF foi estatisticamente significativa. É interessante observar que a quantidade de TNF membranar e solúvel produzidos por macrófagos e induzido pela BK é semelhante a quantidade produzida por macrófagos incubados com LPS mais IFN γ . Estes dados nos mostram que o TNF produzido por células estimuladas com BK é relevante além de ser estatisticamente significativa em relação ao RPMI. Como controle positivo, os macrófagos foram tratados com LPS mais IFN γ e observamos que este estímulo, assim como a bradicinina, também é capaz de induzir a liberação de TNF solúvel e a expressão de TNF membranar.

2 - Cinética da produção de TNF por macrófagos estimulados com Bradicinina ou LPS

Macrófagos foram incubados com RPMI, BK (3 μ M) mais captopril (1 μ M), ou LPS mais IFN γ durante 1, 2 ou 4 horas. A figura 2 nos mostra que o perfil de liberação de TNF membranar e produção de TNF solúvel é semelhante entre os grupos incubados com BK/captopril e LPS/IFN γ . Macrófagos incubados com BK/captopril produziram ambos os tipos de TNF já a partir da primeira hora de incubação e na quarta hora foi observado o pico de produção. Da mesma maneira macrófagos incubados com LPS/IFN γ também produziram TNF a partir

da primeira hora e na quarta observou-se o pico da liberação de TNF membranar e produção de TNF solúvel. Em relação ao grupo incubado com RPMI observamos que o tempo de cultura não induziu as células a produzirem TNF membranar e solúvel. Experimentos adicionais foram realizados incubando-se as células por períodos mais longos (8, 12 e 24 horas), mas foi observado que intensa morte celular, já que no período de incubação das células com os estímulos, o meio de cultura era desprovido de soro bovino fetal para proteger a BK da ação das cininases.

3 - Anticorpo policlonal anti-TNF inibe a atividade citotóxica do TNF produzido por macrófagos peritoneais de camundongos.

Com o objetivo de investigarmos se a atividade citotóxica medida por este ensaio é devido à presença de TNF, um anticorpo policlonal anti-TNF (25 μ l/ml) foi adicionado às amostras. A atividade citotóxica do TNF membranar e o solúvel induzidos por BK/captopril foram inibidas em 70 e 67%, respectivamente. O mesmo observou-se quando macrófagos foram incubados com LPS/IFN γ , a atividade citotóxica foi inibida em 100 e 62%, respectivamente (figura 3). Como controle o anticorpo policlonal anti TNF- α murino neutralizou 85% da atividade biológica do TNF α recombinante murino, na concentração de 700ng/ml.

Baseados nos resultados acima descritos, este trabalho referirá a atividade citotóxica das membranas e sobrenadante de macrófagos estimulados com BK ou LPS mais IFN- γ como TNF- α de membrana e TNF- α solúvel.

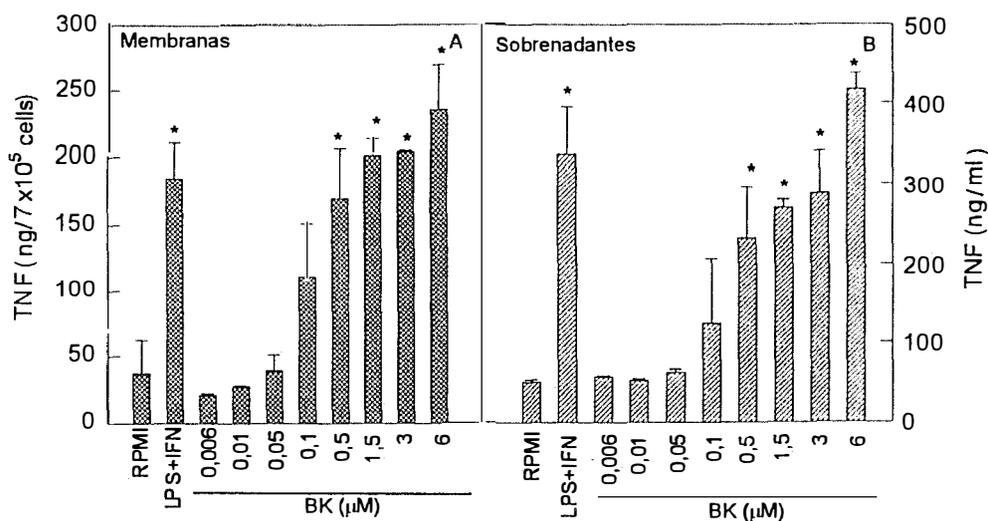


Figura 1: Produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) por macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com bradicinina. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos (7×10^6 células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20 ng/ml) mais IFN (100 U/ml) ou BK (doses indicadas) na presença de captopril ($1 \mu\text{M}$) por 4 horas. As concentrações de TNF membranas (ng/ 7×10^5 células; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B) foram determinadas 4 horas após os estímulos. Resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média por experimento, realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado com o RPMI (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni)

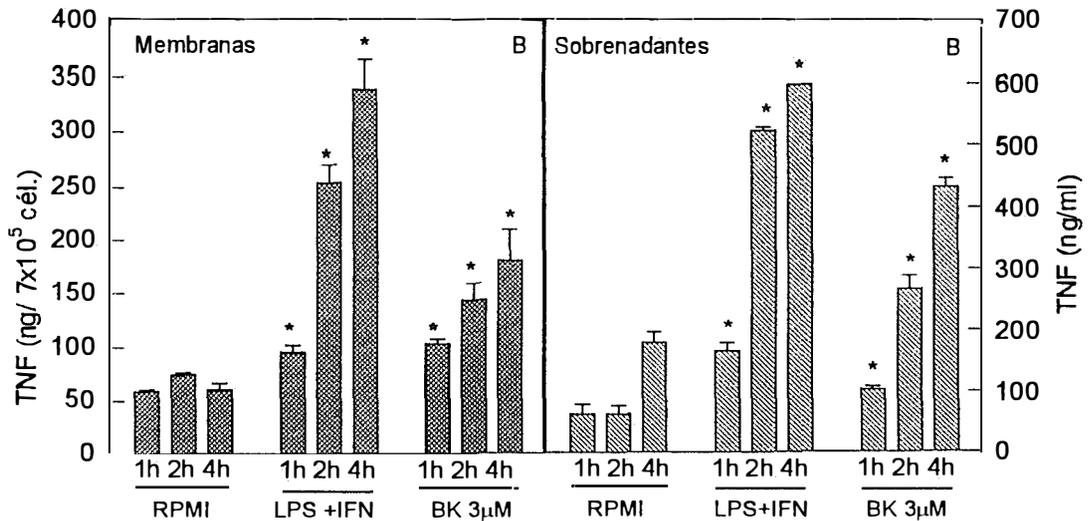


Figura 2: Cinética da produção de TNF por macrófagos estimulados com Bradicinina ou LPS. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos (7×10^6 células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20 ng/ml) mais IFN (100 U/ml) ou com BK (3 μ M) na presença de captopril (1 μ M) por 1, 2 ou 4 horas e as concentrações de TNF membranar (ng/ 7×10^5 células; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B) foram determinadas 4 horas após os estímulos. Resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média por experimento realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado com o RPMI (ANOVA seguido da correção do teste de Bonferroni)

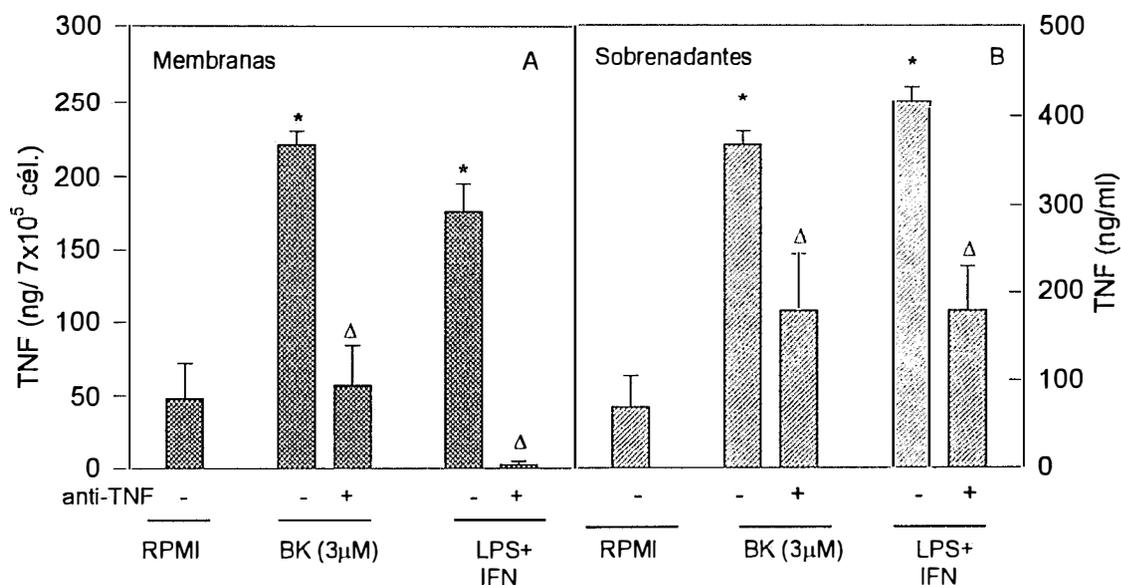


Figura 3: Anticorpo policlonal anti-TNF inibe a atividade citotóxica do TNF membranar e solúvel. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos (7×10^6 células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20ng/ml) e IFN (100U/ml) ou com BK (3μ) na presença de captopril (1μM) por 4 horas. A atividade do TNF no sobrenadante ou nas membranas foram determinadas na presença (+) ou na ausência (-) de anticorpo policlonal anti-TNF (25μl/ml). As barras indicam a concentração de TNF membranar (ng/ 7×10^5 cels; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B). Resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média por experimento realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado com o RPMI. Δ $P < 0,05$ comparado com BK mais captopril ou LPS mais IFN (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

4 - BK induz expressão de TNF membranar e liberação de TNF solúvel somente em animais expostos a um pré-estímulo com adjuvante completo de Freund.

Para estudar se somente macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com ACF capazes de produzir TNF após incubação com BK, macrófagos peritoneais de animais normais também foram estudados. Os macrófagos de animais normais foram incubados com BK (3 μ M) mais captopril (1 μ M). A figura 4 nos mostra que macrófagos peritoniais provenientes de animais normais, quando incubados com BK (3 μ M) e captopril (1 μ M) não são capazes de expressar TNF membranar e liberar TNF solúvel. Por outro lado macrófagos obtidos de animais pré-tratados com ACF foram capazes de produzir tanto o TNF membranar, quanto o TNF solúvel (figura 4). Como controle positivo, macrófagos provenientes de animais normais e animais pré-tratados com adjuvante de Freund foram incubados com LPS e IFN, observou-se que ambos os tipos de TNF foram produzidos tanto por macrófagos de animais normais, quanto por macrófagos de animais pré-tratados.

5 - O papel dos receptores B₁ e B₂ na expressão de TNF membranar e liberação de TNF solúvel por macrófagos estimulados com bradicinina.

5.1 - Antagonista para receptor B₂ da bradicinina (HOE 140) bloqueia a expressão de TNF membranar, mas não interfere na liberação de TNF solúvel por macrófagos estimulados com bradicinina.

Com o objetivo de investigarmos qual o receptor de BK que estaria envolvido na indução de TNF membranar e solúvel por macrófagos tratados com BK, o antagonista para o receptor B₂, HOE 140, nas concentrações de 6, 24 e

48 μ M foi testado. A pré-incubação das células por 30 minutos com o HOE 140 seguida da incubação de BK mais captopril inibiu parcialmente a expressão de TNF membranar em todas as concentrações utilizadas (figura 5, painel A). Por outro lado, este antagonista, nas concentrações usadas não impediu a liberação de TNF solúvel (figura 5, painel B). Como controle a pré-incubação de HOE 140 na concentração de 48 μ M seguida da incubação dos macrófagos com LPS e IFN não interferiu nem na expressão de TNF membranar e nem na liberação de TNF solúvel.

5.2 - O Antagonista para receptor B₁ da bradicinina, (des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina), não interfere na produção de TNF.

A investigação subsequente para se tentar identificar qual o receptor que estaria envolvido no fenômeno de produção de TNF por macrófagos incubadas com BK, macrófagos foram pré-incubados por 30 minutos com antagonista B₁, des-Arg⁹, [Leu⁸]-bradicinina, nas concentrações de 6, 24 e 48 μ M. Diferentemente do que se observou com o antagonista B₂, o antagonista B₁, nas concentrações usadas, não interferiu na expressão de TNF membranar e liberação de TNF solúvel (figura 6). Como controle a pré-incubação do antagonista B₁ na concentração de 48 μ M, seguida da incubação dos macrófagos com LPS e IFN não interferiu na expressão de TNF membranar e na liberação de TNF solúvel.

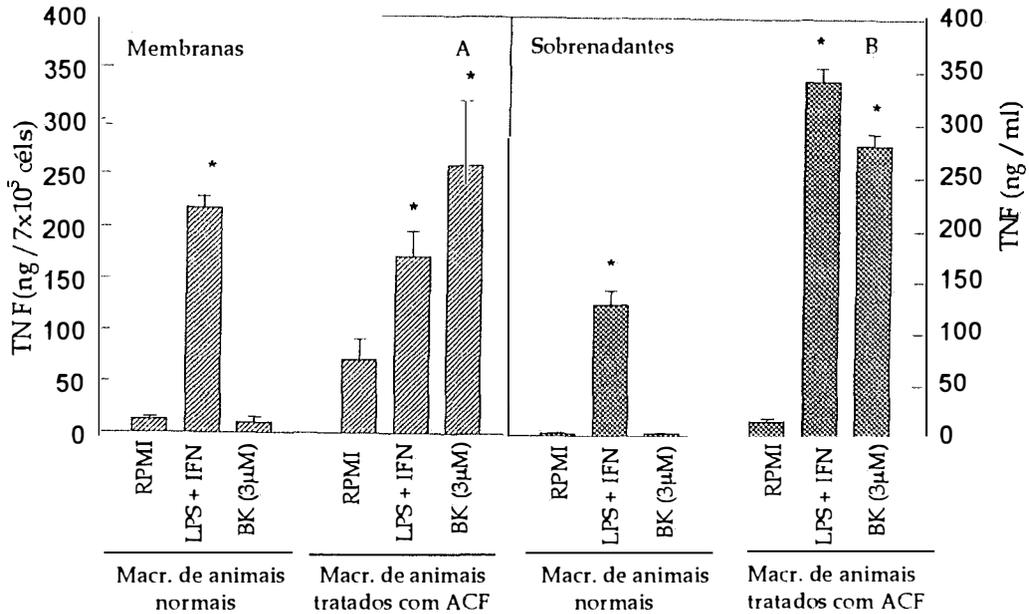


Figura 4: BK induz expressão de TNF membranar e liberação de TNF solúvel somente em animais expostos a um pré-estímulo com ACF. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos normais ou pré-tratados com adjuvante completo de Freund (ACF) (7×10^6 células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20 ng/ml) mais IFN (100 U/ml) ou com BK (doses indicadas) mais captopril (1 μM) por 4 horas. As concentrações de TNF membranar (ng/7 × 10⁵ células; painel A) e TNF solúvel (ng/ml; painel B) foram determinadas 4 horas após os estímulos. Resultados são expressos como a média ± erro padrão da média por experimento, realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. *P<0,05 comparado com o RPMI (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

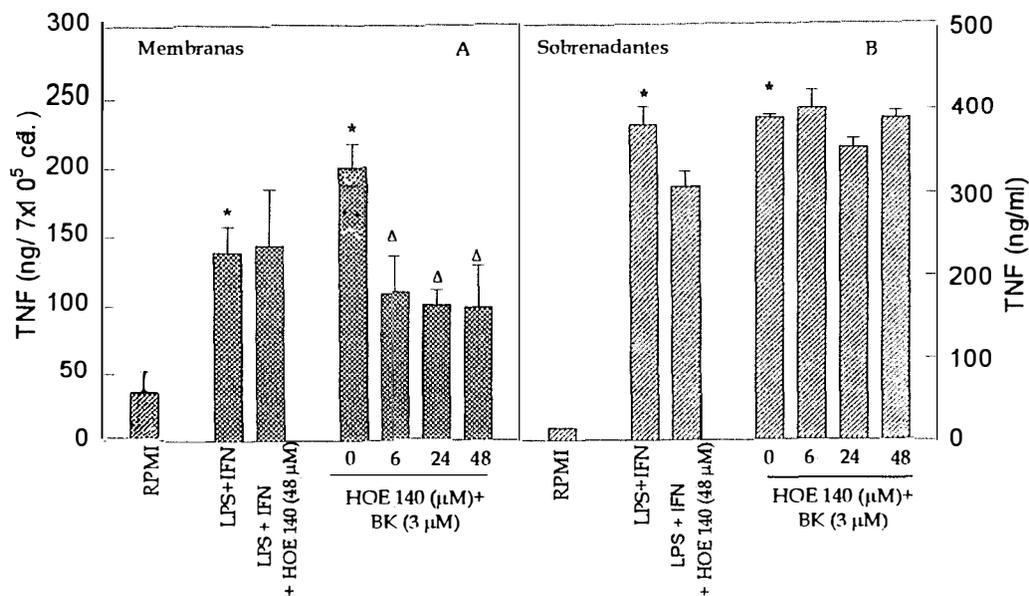


Figura 5: Antagonista para receptor B₂ da bradicinina (HOE 140) bloqueia a expressão de TNF membranar, mas não interfere na liberação de TNF solúvel por macrófagos estimulados com bradicinina. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos tratados com adjuvante completo de Freund (7 X 10⁶ células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20 ng/ml) e IFN (100 U/ml) com ou sem HOE (6-48 μM); BK (3 μM) na presença de captopril (1 μM) com ou sem HOE (6-48 μM) por 4 horas. HOE foi adicionado aos poços 30 minutos antes dos outros estímulos. As barras indicam a concentração de TNF membranar (ng/7 x 10⁵cels; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B). Resultados são expressos como a média ± erro padrão da média por experimento realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. *P<0,05 comparado com o RPMI. Δ P<0,05 comparado com BK mais captoril. (ANOVA seguido da correção do teste de Bonferroni).

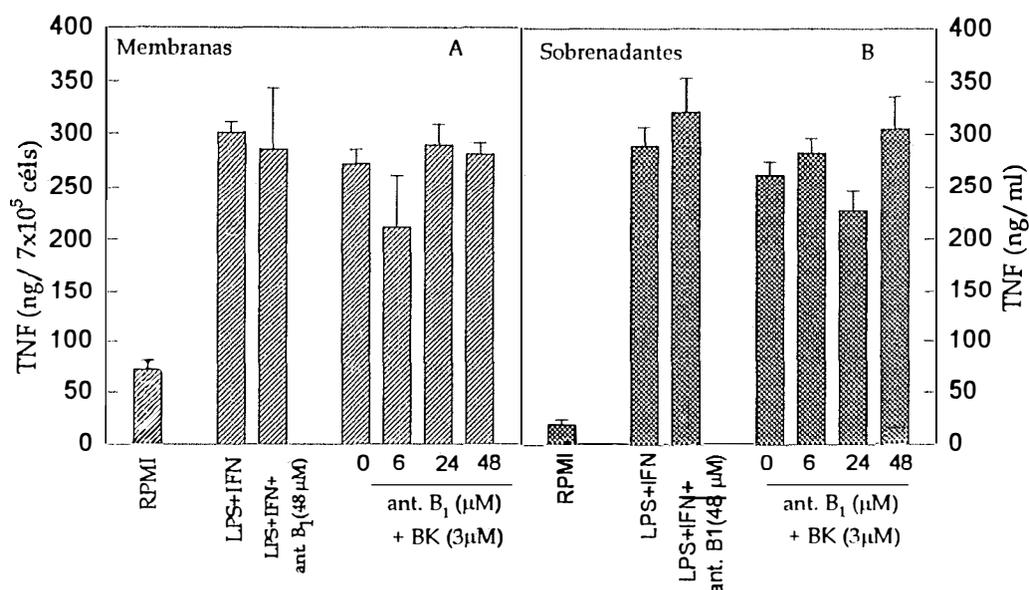


Figura 6: O Antagonista para receptor B₁ da bradicinina, (des-Arg⁹, [Leu⁸] - bradicinina), não interfere na produção de TNF. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos (7X10⁶células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20ng/ml) e IFN (100U/ml) com ou sem antagonista B₁ (6-48μM); BK (3μM) na presença de captopril (1μM) com ou sem antagonista B₁ (6-48μM) por 4 horas. des-Arg⁹, [Leu⁸]-bradicinina foi adicionado aos poços 30 minutos antes dos outros estímulos. As barras indicam a concentração de TNF membranar (ng/7x10⁵cels; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B). Resultados são expressos como a média ± erro padrão da média por experimento, realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. *P<0,05 comparado com o RPMI (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

5.3 - Efeito do agonista B₁, des-Arg⁹-BK, na produção de TNF por macrófagos de camundongos

Estudo com o agonista para receptor B₁ da BK, des-Arg⁹- Bradicinina, vem reforçar os dados anteriormente obtidos. Macrófagos peritoneais foram pré-incubados com agonista B₁ nas concentrações de 1, 3, 9 μM, 30 minutos antes da incubação com BK (3 μM) mais captopril. Nestas concentrações utilizadas, o agonista não foi capaz de induzir a expressão de TNF solúvel e a liberação de TNF membranar (figura 7).

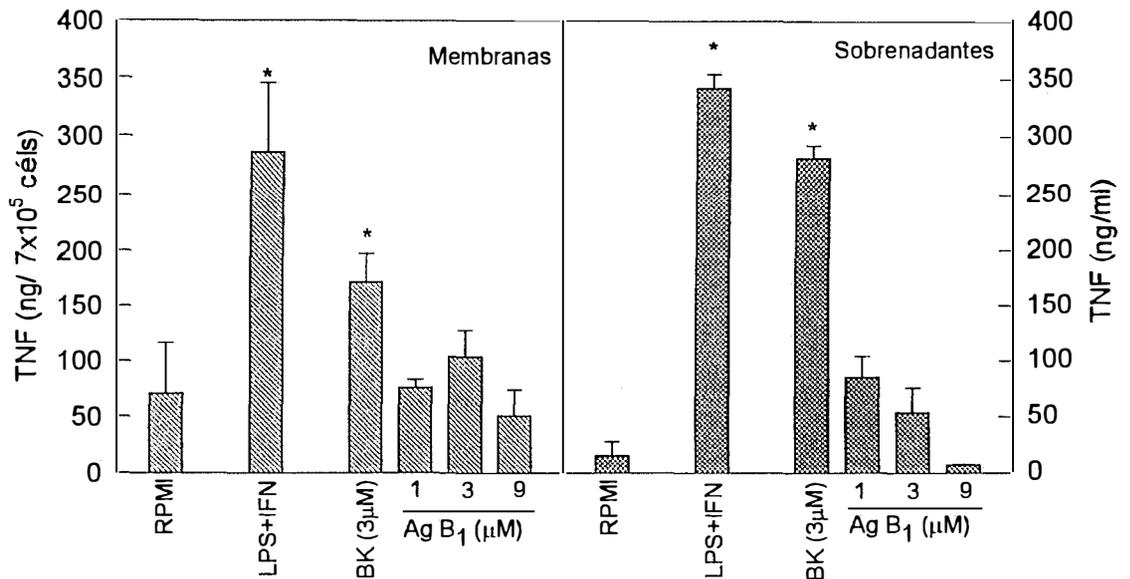


Figura 7: Efeito do agonista B₁, des-Arg⁹-BK, na produção de TNF por macrófagos de camundongos. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos (7X10⁶células/ml/poço) foram incubados com RPMI; LPS (20ng/ml) e IFN (100U/ml) com ou sem agonista B₁ (6-48µM) ou BK (3µM) na presença de captopril (1µM) por 4 horas. Agonista B₁ des-Arg⁹-BK foi adicionado aos poços 30 minutos antes dos outros estímulos. As barras indicam a concentração de TNF membranas (ng/ 7x10⁵cels; painel A) e de TNF solúvel (ng/ml; painel B). Resultados são expressos como a média ± erro padrão da média por experimentos realizados em quadruplicata de três experimentos independentes. *P<0,05 comparado com o RPMI (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

O envolvimento de citocinas na hiperalgesia é fenômeno bem caracterizado por diversos autores. Cunha et al. (1992) demonstraram que o efeito hiperalgésico do TNF- α administrado por via intraplantar e analisado pelo método de Randall-Selitto modificado, dá-se através da produção de IL-1- β , IL-6 (que induzem a liberação de produtos da ciclooxigenase) e IL-8 (induzindo a liberação de aminas simpatomiméticas). Mais tarde Ferreira et al. (1993) demonstraram que o pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF- α ou antagonista B₂ para BK, HOE 140, aboliu o efeito hiperalgésico evocado pela carragenina. Além disto, o anticorpo anti-TNF- α também bloqueou a hiperalgesia induzida pela BK. Foi então sugerido que o efeito hiperalgésico da carragenina ocorre através da liberação de BK, que estimula a liberação de TNF- α .

Confirmando esta proposta o presente trabalho demonstrou que membranas bem como sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos pré-tratados com adjuvante completo de Freund (ACF), incubados *in vitro* com BK, possuem atividade citotóxica, determinados pelo método de citotoxicidade em células WEHI 164 (figura 1). Após uma hora de incubação dos macrófagos com BK já se observou atividade citotóxica das membranas e dos sobrenadantes, sendo que o pico desta atividade ocorreu 4 horas após a estimulação dos macrófagos com BK (figura 2). De maneira semelhante, membranas e o sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS em associação com o IFN- γ apresentaram pico de atividade citotóxica 4h após o estímulo (figura 2).

Com o objetivo de demonstrar que a atividade citotóxica das membranas e do sobrenadante dos macrófagos incubados com BK é devido à presença de TNF- α , um anticorpo anti-TNF- α foi utilizado. Observou-se que este anticorpo anti-TNF- α inibiu a atividade citotóxica das membranas e do sobrenadante de macrófagos estimulados com BK em 70% e 67% respectivamente (figura 3). É importante salientar que a quantidade de TNF membranas que o anticorpo não

inibiu (30%) equivale à quantidade do TNF presente nas membranas controle (RPMI) (figura 3, painel A), evidenciando que o anticorpo foi efetivo em bloquear o TNF- α de membrana, induzido pela BK. Da mesma maneira a atividade citotóxica das membranas e do sobrenadante de macrófagos incubados com LPS e IFN- γ foi inibida em 100 e 62% respectivamente, na presença de um anticorpo anti-TNF- α (figura 3). Neste último caso, apesar da atividade citotóxica residual do sobrenadante ter sido maior do que o controle (RPMI), esta diferença não foi estatisticamente significativa. É possível que esta atividade residual do sobrenadante dos macrófagos possa ser atribuída a outras citocinas liberadas, como por exemplo TNF- β , visto que esta citocina pode ligar-se ao receptor p55 e p75, embora com afinidades diferentes e efetuar resposta citotóxica (painel B). O anticorpo anti-TNF utilizado nestes ensaios neutralizou 85% da atividade citotóxica de 700ng/ml de um TNF- α recombinante murino. Em conjunto estes dados sugerem que a atividade citotóxica das membranas e do sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos pré-tratados com adjuvante completo de Freund e incubados com BK é devida, pelo menos em parte, ao TNF nas suas formas membranar e solúvel. A linhagem celular WEHI 164, clone 13, utilizada no ensaio de citotoxicidade, é sensível tanto a TNF- α membranar, quanto a TNF- α solúvel (Luettig et al., 1989), o que reforça nossas conclusões. Assim os resultados deste trabalho confirmam a proposição feita anteriormente por Ferreira et al. (1993), de que o efeito hiperalgésico da BK é mediado por TNF- α . Recentemente Tiffany & Burch (1989) demonstraram também que as linhagens macrofágicas P388-D1 e RAW 264.7 liberam TNF- α solúvel e IL-1 para o sobrenadante, quando incubadas com BK e que o antagonista B₁ bloqueia a liberação destas citocinas. Nossos resultados demonstraram, entretanto, que além do TNF- α solúvel, a BK induz a expressão de TNF- α membranar nos macrófagos peritoneais de camundongos pré-tratados com ACF.

Curiosamente, macrófagos obtidos de animais normais não produziram TNF- α membranar e solúvel, quando estimulados com BK (figura 4). Por outro lado, quando o estímulo destas células foi o LPS associado ao IFN γ , tanto macrófagos peritoneais obtidos de animais pré-tratados com ACF, tanto aqueles obtidos de animais normais produziram TNF de membrana e solúvel. Pabst & Johnston (1980) mostraram que macrófagos estimulados apenas com LPS foram capazes de liberar citocinas em pequenas quantidades, quando estas células foram expostas a um segundo sinal, por exemplo IFN- γ , a quantidade de citocinas liberadas foi maior. Assim, o fato de BK não induzir a produção de TNF membranar e TNF solúvel por macrófagos peritoneais obtidos de animais normais, sugere que, assim como o LPS associado ao IFN- γ , a BK necessita também de um segundo sinal, que neste estudo é evocado por mediadores endógenos (por exemplo citocinas) liberadas pela estimulação do ACF, que agem sinergicamente com a BK estimulando os macrófagos a produzirem TNF membranar e solúvel.

Para identificar-se qual(is) o(s) receptor(es) da BK envolvido(s) na produção de TNF membranar e solúvel por macrófagos, antagonistas e agonistas para receptores B₁ e B₂ de BK foram utilizados. A expressão do TNF membranar induzida pela BK em animais tratados com adjuvante completo de Freund, foi bloqueada pelo antagonista B₂, HOE 140, enquanto que este antagonista não impediu a produção de TNF solúvel (figura 5). Sugerimos então que o receptor B₂ da BK esteja envolvido na expressão de TNF membranar em macrófagos estimulados com BK, mas não medeia a produção de TNF solúvel nesse sistema. Podemos especular, portanto, que o receptor B₂ medeia eventos locais, através da indução da expressão de TNF membranar. Resultados obtidos em modelo de hiperalgesia estão de acordo com os resultados obtidos *in vitro* para o antagonista B₂, pois o pré-tratamento de animais com HOE 140 bloqueou a hiperalgesia induzida pela BK, sugerindo que também neste sistema o receptor B₂ esteja participando. É interessante observar que o tratamento intraplantar dos

ratos com BK em dose baixa, mas suficiente para evocar hiperalgesia, não induz hiperalgesia na pata contralateral não tratada. Sugerindo que o processo é mediado por TNF membranar. Reforçando esta sugestão, sabe-se que a administração de baixas doses de TNF solúvel promove hiperalgesia em ambas as patas do animal, fenômeno explicado pela efeito sistêmico do TNF solúvel (Cunha et al. 1992). Assim o resultado obtido *in vitro* de que o receptor B₂ participa na expressão de TNF membranar pode explicar o efeito hiperalgésico local da BK. Além disto, Karp et al (1992) demonstraram que uma linhagem de fibrossarcoma murino geneticamente modificada para expressão de TNF membranar, quando injetada subcutaneamente em camundongos não evocou resposta do hospedeiro contra o crescimento deste tumor. Em contrapartida, a mesma linhagem tumoral geneticamente modificada para produzir TNF solúvel sofreu regressão tumoral em 28 dias, efeito que foi abolido com o tratamento com anticorpo anti-TNF.

Na sequência do estudo de receptores envolvidos na produção de TNF induzidos pela BK, o receptor B₁ foi analisado. O antagonista B₁, des-Arg⁹, [Leu⁸]-bradicinina, não bloqueou a produção de TNF membranar e solúvel, sugerindo que o receptor B₁ não participa neste fenômeno (figura 6). Reforçando esse achado, o agonista B₁, des-Arg⁹-BK, não induziu a expressão de TNF membranar e produção de TNF solúvel, confirmando os resultados obtidos com seu antagonista, de que o receptor B₁ aparentemente não participa na produção de ambos os tipos de TNF por macrófagos peritoneais de camundongos, obtidos de animais pré-tratados com adjuvante completo de Freund e incubados *in vivo* com BK (figura 7). Diferente dos resultados *in vitro*, dados não publicados de nosso laboratório demonstraram o envolvimento do receptor B₁ na hiperalgesia. O agonista B₁, injetado por via intraplantar induziu hiperalgesia nos animais (figura 8). Por outro lado, o antagonista B₁ bloqueou a hiperalgesia evocada pela carragenina, BK e ainda pelo próprio agonista B₁. Ficou demonstrado então o envolvimento do receptor B₁ no modelo de hiperalgesia (figura 9); além disto o

pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF- α inibiu a hiperalgisia evocada pela BK e também pelo agonista B₁, evidenciando que o agonista B₁ exerceu seu efeito pela liberação de TNF- α , assim como a BK o faz (figura 10). Portanto, há diferença de envolvimento dos receptores da BK quando comparamos o modelo *in vitro* do presente trabalho e o modelo *in vivo* de hiperalgisia. Algumas possíveis explicações para este fato são:

a - Durante a manipulação das células, desde a coleta do peritônio dos animais até as placas de cultura para estimulação com BK, pode ter havido perda do receptor B₁ pelos macrófagos. Ressalta-se que este receptor necessita ser modulado, não apresentando-se de forma constitutiva nas células. Dados da literatura suportam esta proposição de que receptores B₁ podem ser modulados positivamente por algumas citocinas, como por exemplo a IL-1 (Hall, 1992). A medida que os macrófagos permaneceram em cultura até sua estimulação com BK por 12h, é possível que neste período o possível sinal presente no peritônio dos camundongos envolvido na modulação do receptor B₁, pode não mais estar presente.

b - Pode ser especulada também a falta destes receptores na membrana dos macrófagos, uma vez que macrófagos peritoneais de cobaias normais expressam em sua membrana apenas o receptor B₂ para BK (Böckmann & Paegelow, 1995). Partindo do princípio de que macrófagos não possuem o receptor B₁, podemos inferir que a célula que possui o receptor B₁ em sua membrana não seja o macrófago, já que no modelo *in vivo* muitos outros tipos celulares, como fibroblastos e mastócitos que são capazes de liberar TNF, poderiam possuir este receptor da BK e participarem na resposta hiperalgésica induzida pela BK.

Além da disparidade observada no envolvimento do receptor B₁ no modelo *in vitro* utilizado pelo presente trabalho e no modelo de hiperalgisia, este trabalho não demonstrou qual o receptor responsável pela liberação do TNF solúvel. A este fato, podemos inferir que um subtipo do receptor B₂ da BK (B_{2-A} ou B_{2-B}) (Regoli et al., 1994) ou ainda um outros tipos de receptor como B₃

(Farmer et al., 1989; Farmer & DeSiato, 1994), B₄ e B₅ (Hall, 1994), estejam participando no fenômeno de liberação de TNF solúvel.

Em conclusão, este trabalho demonstrou que a BK induz a produção de TNF solúvel por macrófagos peritoneais de camundongos, confirmando dados de literatura que sugeriam a participação do TNF induzido pela BK no processo hiperalgésico. Além disto, demonstramos que além do TNF solúvel induzido pela BK, a própria BK induz a expressão de TNF membranar em macrófagos. É interessante observar que ambos os tipos de TNF induzidos pela BK só ocorreram em macrófagos obtidos de animais que foram pré-tratados com ACF, evidenciando que os macrófagos, para produzirem TNF membranar e solúvel, quando estimulados com BK, necessitam de um sinal de facilitação, que terá efeito sinérgico com a BK. No que se refere ao receptor envolvido no fenômeno de produção de TNF solúvel e membranar, concluímos que o receptor B₂ participa na produção de TNF membranar por macrófagos incubados com BK, mas não interfere na liberação de TNF solúvel, mediando, provavelmente, um efeito local induzido pela BK. Por outro lado o receptor B₁ parece não participar na produção de TNF membranar e solúvel de macrófagos incubados com BK, quando estudados neste modelo. Finalmente o presente trabalho não demonstrou qual o receptor envolvido na liberação de TNF solúvel, a este resultado podemos inferir a participação de um outro tipo de receptor da BK, como por exemplo B_{2-A} ou B_{2-B}, ou ainda B₃, B₄ ou B₅.

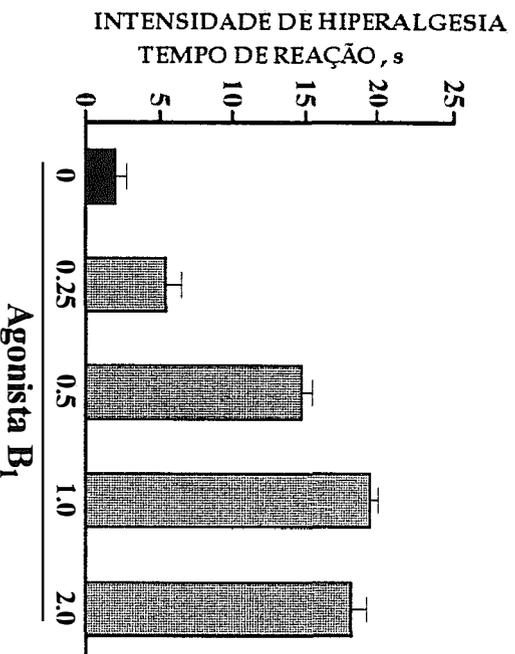


Figura 8: Agonista B₁ da BK, des-Arg⁹-BK, induz hiperalgisia. As barras indicam a intensidade de hiperalgisia nas patas injetadas. Os animais foram injetados (i.pl.) com o agonista B₁ da BK (des-Arg⁹-BK) nas doses indicadas. A intensidade da hiperalgisia foi determinada pelo método de Randall-Sellito modificado, 3h após as injeções. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média em grupo de 5 animais. *P<0,05 comparado com salina (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

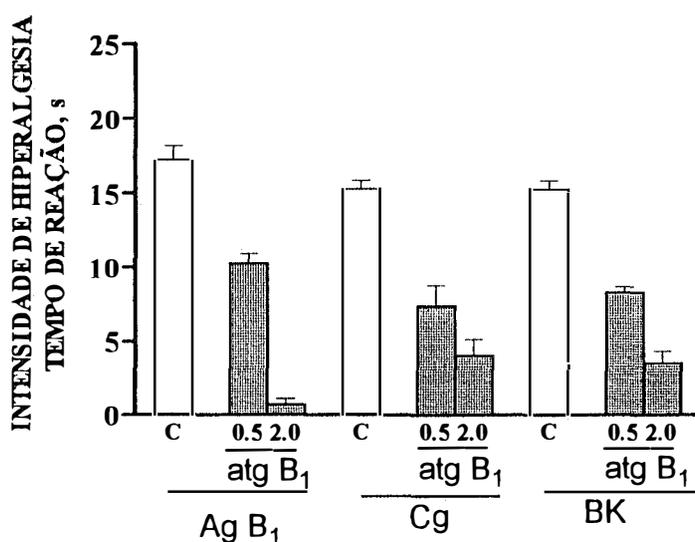


Figura 9: Antagonista B₁ da BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, inibe a hiperalgesia evocada pelo agonista B₁ da BK, pela carragenina e BK. As barras indicam a intensidade de hiperalgesia nas patas injetadas. Os animais foram injetados (i.pl.) com o antagonista B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, nas doses indicadas 30 min. antes da injeção com agonista B₁ (500ng/ 100μl/ pata), carragenina (100μg/ 100μl) e BK (500ng/100μl) administradas na mesma pata. A intensidade da hiperalgesia foi determinada pelo método de Randall-Sellito modificado, 3h após as injeções. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão da média em grupo de 5 animais. *P<0,05 comparado com salina (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

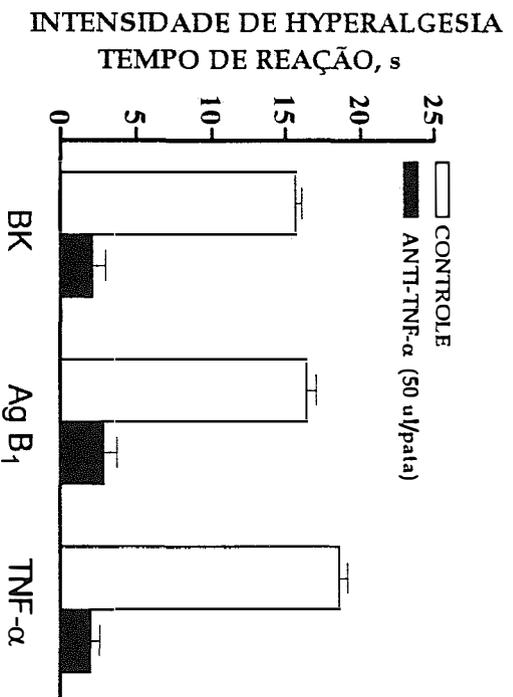


Figura 10: Anticorpo anti-TNF- α bloqueia efeito hiperalгésico evocado pela BK e por seu agonista B₁, des-Arg⁹-BK. As barras indicam hiperalgesia nas patas tratadas. Os animais foram injetados (i.pl.) com anticorpo anti-TNF- α (501/pata) e 30 após foi administrado BK (500ng/ 100 μ l/ pata), agonista B1(500ng/ 100 μ l/ pata), ou TNF- α (2,5pg/100 μ l/pata). A intensidade da hiperalgesia foi determinada pelo método de Randall-Sellito modificado, 3h após as injeções. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média em grupo de 5 animais. *P<0,05 comparado com salina (ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni).

O envolvimento de citocinas, particularmente TNF- α , na hiperalgesia foi demonstrado por nosso laboratório através do modelo de Randall-Selitto modificado, sugerindo que a BK exerce seu efeito hiperalgésico através da liberação desta citocina (Ferreira, 1993). O objetivo do presente trabalho é demonstrar que a BK induz a produção de TNF membranar e solúvel por macrófagos peritoneais de camundongos. Para isto macrófagos foram coletados do peritônio de camundongos pré-tratados com adjuvante completo de Freund e estimulados *in vitro* com BK. As membranas, bem como sobrenadante destas células foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade sobre células WEHI 164 para determinação da presença de TNF nas amostras. Demonstrou-se que membranas e sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos pré-tratados com adjuvante completo de Freund exercem atividade citotóxica em células WEHI 164. Um anticorpo anti-TNF- α bloqueou a atividade das membranas e do sobrenadante de macrófagos incubados com BK em 80 e 60% respectivamente, demonstrando que esta atividade citotóxica se deve predominantemente ao TNF em suas formas membranar e solúvel. Curiosamente, macrófagos provenientes de animais normais incubados com BK não produziram TNF membranar ou solúvel. Por outro lado, o LPS mais IFN γ induziram a produção de TNF de ambos os tipos por macrófagos provenientes de animais normais e daqueles tratados com adjuvante completo de Freund. Este fato sugere que a BK necessita de um segundo sinal, que neste estudo é o adjuvante completo de Freund, que irá facilitar o efeito da BK na indução da produção de TNF membranar e solúvel por macrófagos. Para elucidação do receptor de BK envolvido na produção de TNF membranar e solúvel, agonista e antagonista B₁ e B₂ de BK foram utilizados. A expressão do TNF membranar induzida pela BK foi bloqueada pelo antagonista B₂, HOE 140, enquanto que este antagonista não impediu a produção de TNF solúvel. Assim o receptor B₂ da BK pode estar envolvido na expressão de TNF membranar em macrófagos estimulados com BK, mas não medeia a produção de TNF solúvel quando estudados neste modelo. Diante destes resultados sugerimos que o receptor B₂ pode estar mediando a resposta local induzida pela BK. Quando analisamos o envolvimento do receptor B₁ na produção de TNF membranar e solúvel, observamos que antagonista B₁, des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina, não bloqueou a produção de TNF membranar e solúvel, assim como o agonista B₁, des-Arg⁹-BK não induziu a produção de ambos os tipos de TNF, sugerindo que o receptor B₁ não participa neste fenômeno. Finalmente o presente trabalho não demonstrou qual o receptor envolvido na liberação de TNF solúvel por macrófagos incubados com BK, a este resultado podemos inferir a participação de um outro tipo de receptor da BK, como por exemplo B_{2-A} ou B_{2-b}, ou ainda B₃, B₄ ou B₅. O conjunto dos resultados apresentados confirmam a proposição feita anteriormente por Ferreira et al. (1993) de que BK evoca hiperalgesia, indiretamente, através da produção de TNF solúvel e membranar.

The involvement of cytokines, mainly TNF- α , in the hyperalgesia was suggested by our laboratory, using modified Randall-Sellito method, that BK exerts its hyperalgesic effect through release of this cytokine (Ferreira, 1993). The aim of the present study is to investigate if BK induce the production of membrane-associated and soluble TNF- α by peritoneal murine macrophages. The method used was the harvesting of peritoneal murine macrophages from animals pre-treated with complete Freund's adjuvant (CFA) and then stimulation of these cells *in vitro* with BK. The membranes, as well the supernatants from macrophages were submitted to cytotoxic WEHI 164 assay to determine the presence of TNF- α in the samples. It was demonstrated that membranes and supernatant from peritoneal macrophages obtained from animal pre-treated with Complete Freund's Adjuvant (CFA) have cytotoxic activity under WEHI 164 cells. Antibody against TNF- α blocked 80 and 60% of the cytotoxic activity of membrane and supernatant, respectively, demonstrating that the cytotoxic activity is due to the membrane-associated and soluble TNF- α . Curiously, macrophages from normal animal incubated with BK did not produced associated and membrane forms of TNF- α . However, LPS plus IFN γ induced the production of both type of TNF from macrophages obtained from normal animals and from animals pre-treated with CFA. It suggested us that BK needs a second signal, in this case is CFA, to improve the production of membrane and soluble TNF from macrophages incubated with BK. To study which receptor is involved in the production of membrane and soluble TNF, B₁ and B₂ agonist and antagonist for BK receptor were used. The expression of membrane-associated TNF by macrophages incubated with BK was blocked by B₂ antagonist, HOE 140, however the production of soluble TNF was not interfered by this antagonist. So, the B₂ receptor could be involved in the expression of membrane TNF but it does not interfere in the production of soluble TNF by BK incubated macrophages. We suggested that the B₂ receptor could mediate local response induced by BK. When the B₁ receptor was analyzed, it was observed that the B₁ antagonist, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, blocked neither membrane associated TNF nor soluble TNF. Also the B₁ agonist did not induced the production of both types of TNF, suggesting that the B₁ receptor is not involved in this phenomenon. Finally, the present study did not demonstrated which receptor is involved in the production of soluble TNF by macrophages incubated with BK. It was attributed to another type of BK receptor, for example: B_{2A}, B_{2b}, B₃, B₄ or B₅. As a context, these results confirm the previous suggestion of Ferreira et al. (1993), that BK induce hyperalgesia, indirectly, through production of membrane-associated and soluble TNF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B.B.; POCSIK, E. Cytokines: from clone to clinic. **Archives Biochem.Biophys.**, v.292, p.335-359, 1992.
- BAKOUICHE, O et al. Plasma membrane-associated tumor necrosis factor. A non-integral membrane protein possibly bound to its own receptor. **J. Immunol.**, v.140, p.1142-1147, 1988.
- BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **NEJMAG**, v.334, p. 1717-1725, 1996.
- BERALDO, W.T. Mauricio Rocha e Silva and the discovery of bradykinin. **Agents Actions Suppl.**, v.36, p.134-139, 1992.
- BEUTLER, B.; van-HUFFEL, C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. **Science**, v.264, p. 667-668, 1994.
- BHOOLA, K.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of Kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacology**, v.44, p.1-80, 1992.
- BÖCKMANN, S.; PAEGELOW, I. Bradykinin receptors and signal transduction pathways in peritoneal guinea pig macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, v.291, p.159-165, 1995.
- BOISSONAS, R.A; GUTTMANN, S.; JAQUENOUD, P.A. Synthèse de la L-arginil-L-prolyl-L-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. **Helv. Chim. Acta.**, v.43, p.1349-1355, 1960.

- BONICA J.J. **The management of pain**. 2.ed., Filadelfia, London, Lea & Febiger, 1990.
- BURCH, R.M.; KYLE, D.J. Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. **Life Sciences**, v.50, p.829-838, 1992.
- CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v.72, p.3666-3670, 1975.
- CHENSUE, S.W. et al. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. **Am. J. Pathol.**, v.133, p.564-572, 1988.
- CUNHA, F.Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v.104, p.765-767, 1991.
- CUNHA, F.Q. et al. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.107, p.660-664, 1992.
- CUTHBERT, A.W.; MARGOLIUS, H.S. Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. **Br. J. Pharmacol.**, v.75, p.587-598, 1982.
- DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M-L.; GIFFORD, G.E. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. **J. Immunol.**, v.138, p. 957-962, 1987.

- DECOSTER, E. et al. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.18473-18478, 1995.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. *TINS*, v. 16, p.99-103, 1993.
- ECK, M.J.; SPRANG, R.S. The structure of tumor necrosis factor- α at 2,6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.*, v.264, p.17595-17605, 1989
- ECK, M.J. et al. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin)*. *J. Biol. Chem*, v.263, p.12816-12819, 1988.
- ELLIOT, D.F.; LEWIS, G.P.; HORTON, E.W. The structure of Bradykinin-plasma Kinin from oxblood. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.3, p.87-91, 1960.
- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, v.15, p.S20-S24, 1990, suppl. 6.
- ESPEVIK, T & NISSEN-MEYER, J. A highly sensitive cell line, WEHI 164, clone 13, for measuring cytotoxic factor/ Tumor Necrosis Factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods*, v.95, p. 99-405, 1986.
- FARMER, S.G. et al. Evidence for a pulmonary B₃ Bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.*, v.36, p.1-8, 1989.

- FARMER, S.G.; DeSIATO, M.A. Effects of a novel nonpeptide bradykinin B₂ receptor antagonist on intestinal and airway smooth muscle: further evidence for the tracheal B₃ receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v.112, p.461-464, 1994.
- FERREIRA, S.H. Cytokines and hyperalgesia. **Eur. J. Reumatol. Infl.**, v.11, p.133-138, 1991.
- FERREIRA, S.H. et al. Interleukin-1 β as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, p.698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H. et al. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p. 1227-1231, 1993.
- GEARING, A.J.H. et al. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. **Nature**, v. 370, p.555-557, 1994.
- GRELL, M. et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, v.83, p.793-802, 1995.
- GRUSS, H-J.; DOWER, S.K. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. **Blood**, v.85, p.3378-3404, 1995.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles **Pharmac. Ther.**, v.56, p.131-190, 1992.

- JACOBSEN, S. Separation of two different substrate for plasma Kinin- forming enzyme. *Nature*, v.210, p.98-99, 1966.
- JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P.C. Structure of tumor necrosis factor. *Nature*, v.338, p.225-228, 1989.
- KARP, S.E. et al. In vivo activity of tumor necrosis factor (TNF) mutants. Secretory but not membrane-bound TNF mediates the regression of retrovirally transduced murine tumor. *J. Immunol.*, v.149, p.2076-2081, 1992.
- KRIEGLER, M. et al. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, v.53, p.45-53, 1988.
- LOPEZ-CEPERO, M. et al. Soluble and membrane-bound TNF- α are involved in the cytotoxic activity of B cells from tumor-bearing mice against tumor targets. *J. Immunol.*, v.152, p.3333-3341, 1994.
- LUETTIG, B.; DECKER. T.; LOHMANN-MATTHES, M-L. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J. Immunol.*, v.143, p. 4034-4038, 1989.
- MANDEL, R.J.; COLMAN, R.W.; KAPLAN, A.P. Identification of prekalikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v.73, p.4179-4183, 1976.

- MANOGUE, K.R.; van DEVENTER, S.J.H.; CERAMI, A. Tumour necrosis factor alpha or cachectin. In: THOMSON, A. (ed.) **The cytokine handbook**, London, Academic press, 1992, cap. 241, p.241-256.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptors: a review. **Immunopharmacology**, v.30, p.1-26, 1995.
- NOPHAR, Y. et al. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. **EMBO J.**, v.9, p.3269-3278, 1990.
- PABST, M.J.; JOHNSTON, R.B. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed *in vivo* to muramil dipeptide or lipopolisscharide. **J. Exp. Med.**, v.151, p. 101-114, 1980.
- PAEGELOW, I. et al. Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 306-311, 1995.
- PAIVA, A.C.M et al Selectivity of. bradykinin analogues for receptors mediating contraction and relaxation of the rat duodenum. **Br. J. Pharmacol.**, v.98, p.206-210, 1989.
- PERKINS, M.N.; KELLY, D. Induction of bradykinin B₁ receptors *in vivo* in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1441-1444, 1993.
- REGOLI, D. et al. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. **Life Sciences**, v.55, p.735-749, 1994.

SAWUTZ, D.G. et al. The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.4693-4697, 1994.

SHARMA, J.N.; BUCHANAN, W.W. Pathogenic responses of Bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp. Toxicol. Pathol.*, v.46, p.421-433, 1994

SMITS, G.J.; MCGRAW, D.E.; TRAPANI, A.J. Interaction of ANP and bradykinin peptide during endopeptidase 24.11 inhibition: renal effects. *Am. J. Physiol.*, v.258, p. F1417-F1424, 1990.

STERANKA, L.R. et al. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Neurobiology*, v.85, p.3245-3249, 1988.

STEWART, J.M. Bradykinin B₂ receptor antagonists: development and applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.73, p.787-790, 1995a.

STEWART, J.M. Bradykinin antagonists: development and applications. *Biopolymers (Peptide Science)*, v.37, p.143-155, 1995b.

STEWART, J.M. Roles for Kinins in inflammation. In: HENSON, P.M; MURPHY, R.C. (ed.) **Mediators of the inflammatory process**. USA, Elsevier Science, 1989. Cap. 10, p.189-215.

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. *Immunol. Today*, v.13, p. 151-153, 1992.

TIFFANY, C.W.; BURCH, R.M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Letters*, v.247, p.189-192, 1989.

VANDENABEELE, P. et al. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biol.*, v.5, p.392-399, 1995.

WATKINS, et al. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. *Brain Res.*, v.692, p.244-250, 1995.

WIEMER, G.; WIRTH, K. Production of cyclic GMP via activation of B₁ and B₂ kinin receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.262, p.729-733, 1992.