THIAGO DE OLIVEIRA NOGUEIRA

Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9

São Paulo
2011

THIAGO DE OLIVEIRA NOGUEIRA

Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador: Dra. Renata Giorgi

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2410
FMVZ

Nogueira, Thiago de Oliveira
Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9/ Thiago de Oliveira Nogueira. – 2011.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Dra. Renata Giorgi.

1. S100A9. 2. Neutrófilos. 3. Antinocicepção. 4. Glicogênio. I. Título.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Participação da proteína S100A9 na antinocicepção acarretada por sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal induzido pelo glicogênio ou pela injeção intraplantar desse agente inflamatório em ratos submetidos ao teste de pressão de pata", protocolo nº **529/08**, sob a responsabilidade de Renata Giorgi e Thiago de Oliveira Nogueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **08/10/2008.**

We certify that the research entitled " Participation of S100A9 protein in antinociception caused by the supernatants obtained from the peritoneal exudate induced by glycogen or by the intraplantar injection of this inflammatory agent in rats submitted to the paw pressure test", protocol nº 529/08, under the responsability of Renata Giorgi and Thiago de Oliveira Nogueira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/08/2008.

Vigência do Projeto: 11/2008 – 10/2011	**Nº de animais/espécie**
	414 macho / rato – Wistar

S

São Paulo, 10 de outubro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NOGUEIRA, Thiago de Oliveira

Título: Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, em primeiro lugar, pela vida maravilhosa que me proporcionaram e por estarem ao meu lado me apoiando em todos os momentos, sempre acreditando no meu trabalho. Podem ter certeza de que sempre vou admirá-los. Amo vocês. E ao **meu irmão**, pela amizade e respeito que hoje temos um com o outro. Valeu Brother!

Aos meus avós, Seu Dinarte e Vó Nini, pois muito da minha essência devo a vocês. Posso dizer que graças a vocês fui uma criança muito feliz e que o orgulho que demonstram ter de mim só aumenta mais a minha vontade de crescer. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida. Amo muito vocês.

À Renata Giorgi
Pela oportunidade e confiança que depositou em mim. Sou muito grato por ser seu aluno e seu amigo. Você é a responsável pelo meu amadurecimento como pesquisador. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ida Sano Martins e ao Dr. Luís Roberto C. Gonçalves, pela oportunidade de realizar este trabalho no Laboratório de Fisiopatologia.

Ao Dr. Marcelo Santoro, por ter sido um verdadeiro co-orientador e pela amizade que pude desenvolver durante o desenvolvimento deste trabalho. Você é uma pessoa especial e te admiro muito. Sou muito grato à sua colaboração.

À Dra. Diva Morena, pela colaboração e principalmente por sempre me animar e incentivar quando encontrava dificuldades. Muito obrigado!

À Magna, pelos cortes histológicos e discussões futebolísticas.

À Vanessa Zambelli, por ser a pessoa maravilhosa e sincera que é. Além de que sempre que precisei estava disposta a ajudar. Você é demais.

À Rosana, por ser uma grande amiga e por ter me ensinado tudo quando cheguei ao laboratório. Você foi e é muito importante para mim. Jamais me esquecerei disso.

Ao meu grande amigo Flávião: brother te admiro muito e me espelho muito em você para ser uma pessoa melhor. Espero sempre ter você presente na minha vida.

Ao grande Japonês, Marcião. É muito bom ter você como um dos meus melhores amigos e pode ter certeza que o meu dia a dia não seria tão legal sem você. Sem esquecer as cervejinhas, o futebol e as risadas. Valeu meu irmão!!!

À Andressa. Você que chegou e transformou minha vida. Sou eternamente grato ao tempo que dispensou para me ajudar ficando até altas horas no laboratório. Sem você esse trabalho não seria

completo. Até porque é tudo questão de urgência né?!!! Você é muito especial para mim. Obrigado de coração.

Ao grande amido e falecido Nicolau, que Deus o tenha. Você era o Cara. E espero que Deus goste de samba.

Aos alunos do lab, Natasja, Bianca, Pri, Tati, Sálua, Fê, André Sanson, Luana, Edilene, Lorraine, Rodrigo, Felipe, Odair, Karine, Karen, Karina, Sabrina, Karla,.

Aos grandes amigos Podé, Louise e Tulipa. Vocês sabem que são queridos. Conhecê-los foi uma das melhores coisas que aconteceram comigo no Buta. Valeu pelos momentos de distração e risadas.

À todos os funcionários do laboratório: Cema (você é demais), Neusa, André, Juscelino, Edna, Jane, Meire, Terê e Ângela, vocês fazem parte do processo de construção deste trabalho.

À todos do LEDS: Dra. Yara Cury, Will, Van Gutcha, Renata Dias, Luciana, Fran e Juliana. Valeu pelo suporte sempre que precisei.

Á todos do lab do Britto, pois sempre fui muito bem recebido lá. Adilson, você é fora de série e a nossa amizade foi muito espontânea.

À Melina Casado, por ter me apoiado na maior parte da minha vida acadêmica, suportando momentos difíceis por quais passei. Muito disso aqui devo a você e sou muito abençoado pelos anos maravilhosos que passamos juntos. Você sempre terá o seu canto separado no meu coração. Muito obrigado por tudo.

E ao meu time de coração, Areião F.C. Galera vocês não imaginam como são importantes pra mim. Adoro me divertir aos sábados com vocês. É sempre uma grande aventura jogar neste time.

A todos os amigos que fiz em Sorocaba: Ulisses, Sussmann, Renato, Raposão, Rodrigo, Kayke e Leandro. Meus grandes amigos, vocês fazem a diferença na minha vida. Muito obrigado.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan

RESUMO

NOGUEIRA, T. O. **Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9.** [Antinociceptive effect induced by glycogen in rats submitted to the paw pressure test: relationship with the neutrophilic migration and S100A9 protein expression]. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A peritonite neutrofílica induzida por glicogênio acarreta antinocicepção em camundongos submetidos ao teste de contorção abdominal, a qual é mediada por uma proteína ligante de cálcio, com peso molecular de 14 kDa, denominada S100A9. O objetivo do presente trabalho foi aprofundar o estudo sobre o envolvimento dos neutrófilos na antinocicepção induzida pelo glicogênio em ratos submetidos ao teste de pressão de pata e avaliar a expressão da proteína S100A9 nos tempos onde foi detectado esse efeito. O glicogênio induz antinocicepção em ratos entre 2 e 12 horas após sua injeção intraplantar. O pré-tratamento dos animais com fucoidina, um inibidor de selectinas, não só reverte o efeito antinociceptivo observado como também induz hiperalgesia entre 2 e 6 horas após a injeção do glicogênio. Após 8 horas do tratamento com glicogênio, a fucoidina apenas inibiu a antinocicepção induzida pelo agente inflamatório. A análise histológica demonstrou um aumento na migração de células polimorfonucleares entre 2 e 8 horas após a administração de glicogênio, a qual foi inibida pelo pré-tratamento com fucoidina. Tanto a injeção subcutânea como intraplantar de naloxona, um inibidor inespecífico de receptores opioides, não interferiram no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio, em nenhum dos tempos avaliados. Quanto à expressão da S100A9, analisada por "Western Blotting", foi observado que as amostras obtidas do coxim plantar dos animais injetados com o glicogênio, entre 2 e 12 horas, apresentaram uma banda com peso molecular aproximado de 14 kDa, o qual equivale ao peso da proteína S100A9. A quantificação das bandas marcadas com o anticorpo anti-S100A9, nos tempos entre 2 e 12 horas, demonstrou um aumento significativo da expressão dessa proteína nas amostras obtidas dos animais tratados com glicogênio, em comparação com os tratados com salina. A injeção intraperitoneal de glicogênio induziu um aumento significativo no número total de células presentes na cavidade abdominal dos animais entre a 2º e a 12º hora após o tratamento, representado pelo aumento do número de células polimorfonucleares migradas. Os sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal entre 2 e 12 horas após a injeção de glicogênio, administrados via intraplantar, não só reverteram a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg) como induziram efeito antinociceptivo. Já, o

sobrenadante obtido após 24 horas da injeção de glicogênio reverteu apenas parcialmente o efeito hiperalgésico induzido pela Cg. O tratamento do sobrenadante obtido 4 horas após a injeção do glicogênio com o anticorpo anti-S100A9 aboliu totalmente o efeito antinociceptivo observado com esse sobrenadante sobre a hiperalgesia induzida pela Cg. Esses dados sugerem que a antinocicepção acarretada pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata é dependente da migração neutrofílica, não está relacionado à liberação de peptídeos opioides, mas possivelmente à secreção da proteína S100A9 por essas células. Ainda, os resultados obtidos com os sobrenadantes do exsudato peritoneal após a injeção do glicogênio, demonstram que durante a peritonite neutrofílica é secretada uma molécula capaz tanto de inibir a hiperalgesia acarretada pela carragenina quanto induzir antinocicepção, a qual possivelmente é a proteína S100A9.

Palavras–chave: S100A9. Neutrófilos. Antinocicepção. Glicogênio.

ABSTRACT

NOGUEIRA, T. O. Antinociceptive effect induced by glycogen in rats submitted to the paw pressure test: relationship with the neutrophilic migration and S100A9 protein expression. [Efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata: relação com a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9]. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Neutrophilic peritonitis induced by glycogen causes antinociception in mice subjected to the writhing test, which is médiated by a calcium-binding protein with a molecular mass of 14 kDa, named S100A9. The purpose of this study was to deepen the study on the involvement of neutrophils in glycogen-induced antinociception in rats subjected to the paw pressure test and evaluate the expression of S100A9 protein in time periods when this effect was detected. Glycogen induces antinociception in rats between 2 and 12 hours after intraplantar injection. Pretreatment of animals with fucoidan, a selectin inhibitor, not only reversed the antinociceptive effect, but also induces hyperalgesia between 2 and 6 hours after glycogen injection. Eight hours after treatment with glycogen, fucoidan only inhibited the antinociception induced by the inflammatory agent. Histological analysis showed an increased migration of polymorphonuclear cells between 2 and 8 hours after glycogen administration, which was inhibited by pretreatment with fucoidan. Both intraplantar and subcutaneous injection of naloxone, a nonspecific inhibitor of opioid receptors, did not affect the antinociceptive effect induced by glycogen at all evaluated times. In relation to the expression of S100A9 analyzed by Western blotting, it was observed that the samples obtained from the footpad injected with glycogen, between 2 and 12 hours, had a band with a molecular weight of 14 kDa, which is similar to molecular weight of S100A9. Relative quantification of the bands marked with anti-S100A9 in the time periods between 2 and 12 hours showed a significant increase in protein expression in samples obtained from animals treated with glycogen, compared with those treated with saline. Intraperitoneal injection of glycogen induced a significant increase in the total number of cells in the abdominal cavity of animals between 2 and 12 hours after treatment, represented by increased numbers of migrated polymorphonuclear cells. The supernatants obtained from peritoneal exudate between 2 and 12 hours after injection of glycogen, administered intraplantarly, not only reversed the hyperalgesia induced by carrageenan (Cg) but also induced antinociceptive effect. Already, the supernatant obtained 24 hours after injection of glycogen only partially reversed the

hyperalgesic effect induced by Cg. The treatment of the supernatant obtained 4 hours after injection of glycogen with anti-S100A9 abolished the antinociceptive effect observed with the supernatant on hyperalgesia induced by Cg. These data suggest that antinociception entailed by glycogen in rats submitted to the paw pressure is dependent on neutrophil migration. Moreover, this effect is not related to the release of opioid peptides but possibly to the S100A9 protein secretion by these cells. In addition, the results obtained with the supernatants of peritoneal exudate after glycogen injection show that during neutrophilic peritonitis a molecule able to inhibit carrageenan-induced hyperalgesia is secreted and induce antinociception entailed by glycogen, which is possibly the S100A9 protein.

Keywords: S100A9. Neutrophils. Antinociception. Glycogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao teste de pressão de pata.....	43
Figura 2	Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio.....	45
Figura 3	Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar de animais dos grupos controles.....	47
Figura 4	Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 2 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina.....	50
Figura 5	Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 2 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina.....	50
Figura 6	Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 4 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina.....	51
Figura 7	Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 4 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina.....	51
Figura 8	Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 8 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina.....	52
Figura 9	Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 8 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina.....	52
Figura 10	Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 12 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina.....	53
Figura 11	Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 12 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina.....	53
Figura 12	Avaliação semiquantitativa ao longo do tempo de células polimorfonucleares migradas para o coxim plantar de animais prétratados com salina ou fucoidina e injetados com o glicogênio.....	54
Figura 13	Efeito da injeção subcutânea de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio.....	56
Figura 14	Efeito da injeção intraplantar de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio.....	56
Figura 15	"Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 2 horas após a injeção de salina ou glicogênio.....	58
Figura 16	"Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 4 horas após a injeção de salina ou glicogênio.....	59
Figura 17	"Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 8 horas após a injeção de salina ou glicogênio.....	60

Figura 18 "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 12 horas após a injeção de salina ou glicogênio..... 61

Figura 19 "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 24 horas após a injeção de salina ou glicogênio..... 62

Figura 20 Quantificação relativa da S100A9 ao longo do tempo nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas após a injeção de salina ou glicogênio..... 63

Figura 21 Quantificação do influxo leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos após a injeção de glicogênio..... 65

Figura 22 Cinética do influxo de células polimorfonucleares (PMNs) para a cavidade peritoneal de ratos em resposta a inoculação de glicogênio..... 66

Figura 23 Cinética de influxo de células mononucleares (MNs) para a cavidade peritoneal de ratos em resposta a inoculação de glicogênio..... 67

Figura 24 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 2 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 70

Figura 25 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 4 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 71

Figura 26 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 8 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 72

Figura 27 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 12 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 73

Figura 28 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 24 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 74

Figura 29 Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 4 horas da injeção do glicogênio incubado com o anti S100A9sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME – 2-mercaptoetanol
BCA – ácido bicinconínico
BCG – bacilo de Calmette e Guérin
CD – *cluster of differentiation*
CFA – adjuvante completo de Freund
Cg – carragenina
CO_2 – dioxido de carbono
Ctab – *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*
Cys – cisteína
DAMP – *danger-associated molecular pattern*
DF 2162 – *(4-[(1R)-2-amino-1-methyl-2-oxoethyl]phenyl trifluoromethane sulphonate)*
e.p.m. – erro padrão da média0
FGSF – *fibroblast growth-stimulating factor*
fMLP – *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*
Fuc – fucoidina
Gli – glicogênio
Gly – glicina
GM-CSF – *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
H/E – hematoxilina/eosina
H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HCl – ácido clorídrico
His – histidina
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
JNK – *junk kinase*
kDa - kiloDalton
LPS – lipopolissacarídeo
LTB-4 – leucotrieno B4
Mac-1 β2 – antígeno do macrófago-1
MAPK – *mitogen-activated protein kinase*
MDF – *macrophage deactivator factor*
MDSC – *myeloid-derived suppressor cells*
MI – medida inicial
MN – células mononucleares
MPO – mieloperoxidase
MRP – *MIF related proteins* ou *myeloid related proteins*
NGF – *nerve growth factor*
NO – óxido nitrico
Nx – naloxona
PAF – *platelet–activating factor*
PAR – receptor ativado por protease
PBS – *phosphate buffered saline*
PKC – proteina quinase C
PMNs – células polimorfonucleares
Sal – salina
SDS – *sodium dodecyl sulfate*
TLR 4 – *toll like receptor 4*
TNF-α - *tumor necrosis factor-α*

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	19
1.1	Considerações gerais sobre a inflamação	19
1.2	Neutrófilos e resposta dolorosa	19
1.3	Proteínas S100A8/S100A9	24
2	**OBJETIVO**	32
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	34
3.1	Animais	34
3.2	Indução da resposta inflamatória	34
3.2.1	Glicogênio (Gli)	34
3.2.2	Carragenina (Cg)	35
3.3	Tratamentos	35
3.3.1	Fucoidina	35
3.3.2	Naloxona	35
3.4	Avaliação da sensibilidade dolorosa	36
3.5	Processamento dos coxins plantares de ratos para análise histológica	36
3.5.1	Coleta do material	36
3.5.2	Técnica de H/E	36
3.6	Avaliação semiquantitativa das células polimorfonucleares migradas para o Coxim plantar	37
3.7	Detecção da proteína S100A9 no coxim plantar dos animais após a injeção de glicogênio – “Western Blotting”	37
3.8	Contagem total e diferencial de leucócitos e obtenção dos sobrenadantes dos exsudatos inflamatórios	39
3.9	Injeção intraplantar concomitante dos sobrenadantes obtidos do exsudato inflamatório com a carragenina	39
3.10	Tratamento *in vitro* do sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio com o anticorpo anti-S100A9	40
3.11	Análise Estatística	40
4	**RESULTADOS**	42
4.1	Determinação do tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos avaliados no teste de pressão de pata	42
4.2	Participação dos neutrófilos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio	44
4.3	Análise histológica do coxim plantar de animais injetados com glicogênio pré-tratados ou não com fucoidina e avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares migradas	46
4.4	Avaliação da participação de peptídeos opioides no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio	55
4.5	Detecção por “Western Blotting” e quantificação relativa da proteína S100A9 no sobrenadante obtido do tecido do coxim plantar dos animais tratados com salina ou glicogênio	57
4.6	Caracterização do perfil de migração celular induzida pela injeção intraperitoneal de glicogênio em ratos	64
4.7	Avaliação do efeito da injeção intraplantar de sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal induzido pelo glicogênio sobre a hiperalgesia acarretada pela carragenina	69

4.8 Efeito do tratamento do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após a injeção de glicogênio com o anticorpo anti-S100A9 sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina..... 75
5 DISCUSSÃO..... 78
6 RESUMO DOS RESULTADOS..... 88
7 CONCLUSÕES..... 90
8 REFERÊNCIAS..... 92

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a inflamação

A reação inflamatória é a resposta local do organismo a uma agressão ou trauma, marcada por fenômenos complexos como vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, exsudação leucocitária e plasmática com consequente migração de leucócitos para o tecido inflamado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Em meio a esses fenômenos, a fagocitose e a eliminação de debris celulares ou eventuais microorganismos, pelos fagócitos, se apresentam como principal evento da reação inflamatória, propiciando o reparo e substituição do tecido lesado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Após a lesão tecidual ocorre a liberação de mediadores químicos, plasmáticos, celulares e teciduais, os quais são responsáveis pelas alterações homeostáticas traduzidas nos sinais clássicos da inflamação, como rubor, calor, dor e tumor (WEISSMANN, 1992; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Ainda, a resposta inflamatória envolve processos celulares que são regulados por inúmeros sinais específicos que estimulam diferentes tipos de células, desenvolvendo uma cascata de eventos que incluem, entre outros fenômenos, o recrutamento e a ativação de leucócitos (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

Durante o recrutamento de leucócitos, observa-se nos estágios iniciais da inflamação, qual seja a fase aguda, intensa migração de células polimorfonucleares (PMNs) para o foco da lesão. Assim, PMNs são as células majoritárias nessa etapa, as quais sobrevivem entre 12 e 24 horas. Em contrapartida, após 24 horas de inflamação inicia-se a fase crônica, as células PMNs (neutrófilos) entram em apoptose, são fagocitadas e substituídas por macrófagos, as células predominantes nesse estágio do processo (INSEL, 1996; GALLIN; SNYDERMANN, 1999).

1.2. Neutrófilos e resposta dolorosa

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco de lesão durante a resposta inflamatória aguda e, além de desempenharem um importante papel na fase inicial do processo

pela sua capacidade fagocítica, essas células são capazes de liberar diversos mediadores químicos que participam do desencadeamento do processo inflamatório.

A literatura tem demonstrado que os neutrófilos são capazes de liberar, por exemplo, metabólitos do ácido araquidônico, como os eicosanóides, e o fator de ativação plaquetária (PAF - *Platelet-Activating Factor*) (MOILANEN et al., 1993; BAULDRY; WOOTEN, 1996; SYRBU et al., 1999), e produzir citocinas como a interleucina (IL)-1, que induz a produção de IL-6 e IL-8, o fator de necrose tumoral (TNF - *Tumor Necrosis Factor*-α) e o fator estimulador de colônia macrófago-granulócito (GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) (LINDEMANN et al., 1989; DUBRAVEC et al., 1990; DINARELLO, 1991; LORD et al., 1991; MOILANEN et al., 1993; BAULDRY; WOOTEN, 1996; SYRBU et al., 1999). Com relação à função desses mediadores, citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IL-6, bem como a quimiocina IL-8, podem atuar na liberação/produção de mediadores hiperalgésicos, como as prostaglandinas e aminas simpáticas (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; FERREIRA, 1994).

Considerando que os neutrófilos secretam mediadores capazes de induzir hiperalgesia, é plausível sugerir que essas células, por meio da produção de citocinas, estejam envolvidas na gênese da dor durante o processo inflamatório. Diversos trabalhos empregando modelos experimentais para a avaliação da sensibilidade dolorosa têm buscado demonstrar que os neutrófilos medeiam a hiperalgesia durante a inflamação induzida por distintos agentes irritantes.

Neste sentido, estudos experimentais demonstraram que as citocinas IL-1 e TNF-α injetadas pela via intraplantar reduzem o limiar nociceptivo mecânico de ratos, em um processo dependente de prostaglandina (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2000). Em inflamação induzida por carragenina, LPS, Bradicinina, TNF-α e IL-1β foi evidenciado que o antagonista de receptor para IL-1 reverte a hiperalgesia causada por esses compostos, indicando que o desenvolvimento da dor inflamatória observada no modelo de pressão de pata é dependente da ativação/liberação de citocinas (CUNHA et al., 2000). Em outro trabalho realizado por Cunha et al. (2008a), o tratamento de camundongos com a quimiocina CXCL1, com o LPS ou com a carragenina induziu hipenocicepção mecânica, a qual foi acompanhada de intenso influxo de neutrófilos para a pata dos animais. Os efeitos observados foram revertidos pelo pré-tratamento dos animais com o composto DF 2162, um inibidor de receptor CXCR1/2 para quimiocinas. Uma vez que esses receptores participam do recrutamento neutrofílico, foi sugerido que os neutrófilos estão associados à

indução de hipernocicepção inflamatória induzida por CXCL1, LPS ou carragenina (CUNHA et al., 2008a). Em modelo de artrite induzida por antígeno na articulação do joelho de camundongos, foi demonstrado que a hipernocicepção observada está relacionada ao acúmulo de neutrófilos na articulação e à produção local de citocinas pró inflamatórias como TNF-α, IL-1β e CXCL-1 (SACHS et al., 2011). Ainda, tem sido relatado que os neutrófilos contribuem para a gênese da dor inflamatória articular em modelo de artrite induzida por zimosan por produzirem mediadores hiperalgésicos como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de nitrogênio (BEZERRA et al., 2007).

A importância da migração neutrofílica para o foco de lesão no desencadeamento da dor inflamatória também tem sido observada em modelo de depleção de neutrófilos circulantes, com anticorpo anti-neutrófilo de ratos, e/ou a inibição da migração dessas células pelo tratamento dos animais com fucoidina, um inibidor de selectinas, visto que esses tratamentos suprimem a hiperalgesia em diferentes métodos de avaliação da sensibilidade dolorosa (BEZERRA et al., 2007; CUNHA et al., 2008a,b; TING et al., 2008; VERRI et al., 2009).

Desta forma, foi demonstrado que a depleção de neutrófilos da circulação periférica abole a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar do NGF (*Nerve Growth Factor*), bem como a hiperalgesia mecânica induzida pelo leucotrieno B4 (LTB4) (LEVINE et al., 1984; BENNETT et al., 1998). O bloqueio da adesão e migração de neutrófilos, em modelo inflamatório induzido por IL-15, acarreta em uma diminuição significativa da hipernocicepção mecânica, sugerindo que a migração de neutrófilos regula a indução desse fenômeno (VERRI, 2006). Resultados obtidos com modelo de inflamação decorrente de reação alérgica demonstraram por análise histológica e ensaio de MPO (mieloperoxidase) um aumento significativo de neutrófilos na pata inflamada de ratos, bem como um aumento da hiperalgesia térmica induzida pelo alergeno (LAVICH et al., 2006). A depleção sistêmica de neutrófilos ou o bloqueio da migração dessas células inibiu a resposta hiperalgésica térmica na pata dos animais, indicando mais uma vez que o recrutamento de neutrófilos é crucial para o desenvolvimento da hiperalgesia nesse modelo de inflamação (LAVICH et al., 2006). Foi também demonstrado que a depleção de neutrófilos em ratos reverte a hiperalgesia mecânica em modelo de artrite induzida por zimosan, e que a remoção das espécies reativas de nitrogênio presentes na articulação inflamada, pela administração de ácido úrico, inibiu tanto a hiperalgesia articular como o influxo neutrofílico. Esses dados sugerem uma correlação entre o influxo de neutrófilos para articulação durante a inflamação induzida pelo zimosan com o desencadeamento da hiperalgesia mecânica (BEZERRA et al., 2007).

Ainda, foi demonstrado por Cunha et al. (2008b) que a administração de fucoidina, em ratos injetados pela via intraplantar com carragenina, inibe a migração neutrofílica para a pata dos animais com consequente inibição da hipernocicepção mecânica. Entretanto, esses autores verificaram que, apesar da importância dessas células na indução da hiperalgesia induzida pela carragenina, não são os neutrófilos responsáveis pela liberação local de citocinas hiperalgésicas como TNF-α e IL-1β nesse modelo inflamatório. Assim, foi sugerido que as citocinas responsáveis pelo desenvolvimento da hiperalgesia nesse modelo poderiam ser produzidas por células residentes, como os macrófagos, mastócitos e fibroblastos (CUNHA et al., 2008b).

Apesar das evidências sobre a participação do neutrófilo no desencadeamento da dor durante a inflamação, muitos dos mediadores inflamatórios relacionados ao desenvolvimento da hiperalgesia são liberados tanto por células polimorfonucleares como por outros tipos de leucócitos, por exemplo, monócitos/macrófagos. Assim, a hiperalgesia mediada pelo LTB4, o fragmento C5a do complemento, o fMLP ou o NGF não pode ser atribuída exclusivamente a presença de células PMNs no foco inflamatório (RITTNER et al., 2006a). Em adição, vários estudos que propõem um papel para as células PMNs na indução da hiperalgesia utilizam depleção não seletiva de leucócitos (LEVINE et al., 1984; LEVINE et al., 1985), ou ainda detectam diferenças no limiar nociceptivo dos animais apenas nos tempos em que monócitos/macrófagos também encontram-se significativamente depletados (BENNETT et al., 1998).

Em contrapartida aos dados descritos acima, outros estudos se concentram na investigação do efeito regulador/inibitório das células polimorfonucleares sobre a resposta dolorosa, ou ainda, na demonstração de que a migração neutrofílica, por si só, não á capaz de acarretar hiperalgesia. Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar a participação do neutrófilo no controle da dor inflamatória via liberação de peptídeos opioides endógenos (CZLONKOWSKI; STEIN; HERZ, 1993; SCHAFER; CARTER; STEIN, 1994; BRACK, 2004; BRACK et al., 2004a,b; RITTNER et al., 2006b; RITTNER et al., 2009a,b; HACKEL et al., 2010). Os peptídeos opioides, os quais inibem a dor por produzirem efeitos semelhantes aos da morfina por uma ação em receptores opioides (RANG et al., 2007), foram descritos em células imunes residentes no tecido inflamado, em que a maioria dos leucócitos que contém opioides durante as primeiras 24 horas da inflamação são os neutrófilos, enquanto que nos estágios mais tardios o predomínio ocorre nos monócitos/macrófagos (STEIN et al., 1990; HASSAN et al., 1992; PRZEWLOCKI et al., 1992; STEIN, 1995; CABOT, 2001; RITTNER

et al., 2001; RITTNER et al., 2006b; para revisão MACHELSKA, 2007; RITTNER et al., 2009a).

A ação antinociceptiva de peptídeos opioides, secretados pelas células PMNs, foi detectada nos estágios iniciais da inflamação em animais submetidos ao teste de pressão de pata após a injeção do adjuvante completo de Freund (CFA) (STEIN et al., 1989; CZLONKOWSKI; STEIN; HERZ, 1993). Ainda, foi demonstrado que citocinas, como o TNF-α, a IL-1β, o fator liberador de corticotrofina, bem como o estresse acarretado por natação em água fria, induzem a secreção de opioides por essas células, com consequente efeito antinociceptivo na fase inicial do processo inflamatório (STEIN et al., 1989; CZLONKOWSKI; STEIN; HERZ, 1993; SCHAFER; CARTER; STEIN, 1994). Adicionalmente, Rittner et al. (2006b) empregando o modelo de inflamação induzido por CFA, em ratos submetidos aos testes de hiperalgesia mecânica e térmica, demonstraram que ligantes do receptor para quimiocinas (CXCR2) induz o recrutamento de células PMNs para o coxim plantar dos animais com conseqüente liberação de peptídeos opioides, a qual é dependente de cálcio intracelular, acarretando em inibição da dor inflamatória. Assim, para que haja a liberação dos peptídeos opioides dos neutrófilos migrados é necessário um segundo estímulo, como a natação dos animais em água fria (STEIN et al., 1990), ou a injeção intraplantar de hormônio liberador de corticotrofina, ou citocinas (SCHAFER; CARTER; STEIN, 1994), ou quimiocinas como a CXCL2/3 (RITTNER et al., 2006b, 2007). Em adição, foi demonstrado que o recrutamento seletivo de neutrófilos pela injeção intraplantar de quimiocinas (CXCL1 ou CXCL2/3) não induz edema de pata, nem hiperalgesia mecânica ou térmica, bem como ativação neuronal na medula espinhal de ratos (RITTNER et al., 2006a). Em complementação, foi demonstrado que injeção intraplantar de glicogênio, o qual tem a capacidade de atrair células PMNs para o tecido inflamado, não produz, por si só, um efeito significativo sobre a hiperalgesia mecânica (LEVINE et al., 1985). Os resultados obtidos por Rittner et al. (2006a) e Levine et al. (1985) sugerem que a presença de neutrófilos no local da lesão não é fator determinante para o desenvolvimento da hiperalgesia.

Ainda, trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo enfocam a participação dos neutrófilos na inibição da dor inflamatória, porém sem creditá-la à secreção e ação dos peptídeos opioides, mas sim pela atividade de uma proteína ligante de cálcio denominada S100A9, a qual está presente em quantidades elevadas no citosol de neutrófilos (GIORGI et al., 1998; PAGANO, 2001; PAGANO et al., 2002; PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006).

1.3. Proteínas S100A8/S100A9

Uma variedade de substâncias biologicamente ativas secretadas por leucócitos estão envolvidas na fisiopatologia do processo inflamatório. Dentre elas, duas proteínas ligantes de cálcio S100A8 e S100A9 (SCHAFER et al., 1995), pertencentes à família das proteínas S100 (KLIGMAN; HILT, 1988) são secretadas por neutrófilos, monócitos e macrófagos. As proteínas S100A8/A9 podem ser expressas por células epiteliais e endoteliais ativas (BRANDTZAEG; DALE; GABRIELSEN, 1992; YEN et al., 1997).

Estas proteínas foram inicialmente denominadas de MRP-8 e MRP-14 (ODINK et al., 1987), pelo fato de terem sido isoladas, sequenciadas e clonadas de cultura de células em que se tentava caracterizar o fator inibitório de migração (MIF - *Migration Inhibitory Factor*), assim MRP de *MIF Related Proteins* e 8 ou 14 para designar seus pesos moleculares (ODINK et al., 1987; HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993). Ainda, essas proteínas foram denominadas de *Myeloid Related Proteins* (RAMMES et al., 1997), visto que são expressas por células de linhagem mielomonocíticas. As moléculas S100A8 e A9 foram caracterizadas por diferentes pesquisadores e classificadas como MRP-8 e MRP-14 (ODINK et al., 1987), p8 ou 14 (HOGG; ALLEN; EDGEWORTH, 1989), cadeia leve da L1 ou pesada da L1 (ANDERSSON et al., 1988) e calgranulina A ou B (KELLY; JONES; FLEMING, 1989), respectivamente. Além disso, o complexo das duas proteínas é chamado de calprotectina (STEINBAKK et al., 1990). Uma característica comum a elas é que possuem a presença de dois sítios ligantes de cálcio (HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993).

As proteínas S100A8 e S100A9 são encontradas no citosol de granulócitos, principalmente em neutrófilos e monócitos em proporções de 45% e 1%, respectivamente, das proteínas citosólicas totais (EDGEWORTH et al., 1991). A expressão dessas proteínas está ausente em linfócitos e macrófagos teciduais (LAGASSE; CLERC, 1988; ZWADLO et al., 1988). Assim, os neutrófilos são as principais células inflamatórias que contém S100A8 e S100A9 (ODINK et al., 1987). Com relação à proteína S100A9, há duas isoformas presentes nos neutrófilos, uma forma mais abundante classificada como proteína inteira (full lenght), compondo cerca de 70% do total de S100A9 no citosol dessas células e outra forma denominada truncada, presente em menor proporção e caracterizada pela perda do resíduo Cys presente na proteína inteira (LIM et al., 2010). Além da diferença conformacional, a forma truncada da S100A9 demonstrou-se

incapaz de sofrer S-Glutationilação ou S-Nitrosilação, indicando que as duas isoformas da proteína podem apresentar diferenças funcionais (LIM et al., 2010).

A secreção da S100A8/A9 foi demonstrada por Rammes et al. (1997), os quais descreveram que estas proteínas são secretadas por monócitos após ativação da PKC por uma via dependente de microtúbulos intactos. Altos níveis de calprotectina foram detectados no soro de pacientes com artrite reumatóide, sarcoidose e fibrose cística, sugerindo que estas proteínas são secretadas em diferentes condições patológicas (KERKHOFF; KLEMPT; SORG, 1998). Considerando que altas concentrações do complexo S100A8/A9 são encontradas no fluido sinovial, fezes, urina e soro/plasma sanguíneo durante processo inflamatório, a calprotectina vem sendo amplamente empregada como marcador laboratorial clínico de inflamação, especialmente para diagnosticar doenças não infecciosas como artrite reumatóide (FOELL; ROTH, 2004a), doença de Crohn (LUGERING et al., 1995) e fibrose cística (GOLDEN et al., 1996), uma vez que indica a ativação de fagócitos de forma mais sensível que a proteína C reativa e a creatinina sérica (FREEMONT; HOGG; EDGEWORTH, 1989; FOELL et al., 2004b). Ainda, tem sido sugerido que a determinação dos níveis do complexo S100A8/S100A9 no líquido sinovial de articulações pode ser usada como biomarcador de processo inflamatório durante artrite reumatóide (LIAO et al., 2004). Assim, DRYNDA et al. (2004) propuseram que a quantificação do complexo S100A8/S100A9 no líquido sinovial possa ser empregada para discriminar a artrite reumatóide de outras doenças inflamatórias observadas em articulações, como a osteoartrite.

A literatura tem demonstrado que o complexo S100A8/A9, quando testado *in vitro* sobre diferentes organismos, possui atividade microbicida a qual é decorrente da captação de zinco pelo sítio específico desse íon presente nessas proteínas (SANTHANAGOPALAN; HAHN; SOHNLE, 1995; SOHNLE; HAHN; SANTHANAGOPALAN, 1996). Ainda, a calprotectina pode inibir o crescimento das células da medula, além de ser um fator negativo para o crescimento de células tumorais (YUI; MIKAMI; YAMAZAKI, 1995b). Também foi observado que o complexo induz a apoptose em certos tipos de células tumorais e a presença de zinco inibe esse efeito (YUI; MIKAMI; YAMAZAKI, 1995a).

Dentre alguns dos seus efeitos biológicos, especificamente durante o processo inflamatório, muitos trabalhos relatam uma função pró-inflamatória para as proteínas S100A8, S100A9 ou para o complexo formado pelas duas proteínas. Dessa forma, foi demonstrado que a proteína S100A9 age seletivamente na exsudação leucocitária, estimulando a adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular via molécula de adesão Mac-1 β2 integrina (NEWTON; HOGG, 1998).

Ainda, foi demonstrado que o acúmulo de neutrófilos induzido pelo LPS no modelo de "air pouch" de inflamação é revertido pela imunização previa dos animais com IgG purificada contra a S100A8 e S100A9, evidenciando a importância das duas proteínas para a migração de neutrófilos no modelo inflamatório estudado (VANDAL et al., 2003). Já em modelo de artrite reumatóide induzida em ratos, foi observado que o aumento da produção da proteína S100A9 regula positivamente a adesão, migração e quimiotaxia de neutrófilos (SHIMADA et al., 2007). Dados recentes demonstraram que o complexo S100A8/S100A9 é responsável pelo acúmulo de macrófagos e neutrófilos no tecido vascular, espessamento da camada neointima e produção de citocinas inflamatórias por macrófagos em modelo experimental de vasculite, aterosclerose e de inflamação induzida pela injúria vascular (CROCE et al., 2009). Essas evidências sugerem que o complexo pode regular a inflamação vascular de modo a facilitar o desenvolvimento de doenças vasculares (CROCE et al., 2009).

Com relação aos efeitos pró-inflamatórios das proteínas S100A8 e S100A9, tem sido proposto que essas proteínas possam agir como alarminas ou DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns* - padrões moleculares associados ao perigo), sinalizando o perigo iminente ao hospedeiro quando secretadas em resposta à ativação celular ou liberadas após o dano celular (VOGL et al., 2007; SIMARD et al., 2009; LOSER et al., 2010; DESSING et al., 2010). Foi demonstrado que as proteínas S100A8/A9 participam da amplificação da resposta de fagócitos em modelo de inflamação induzida por LPS (VOGL et al., 2007). Animais knockouts cujos leucócitos não expressavam as proteínas S100A8/S100A9 apresentaram reduções evidentes da resposta inflamatória desencadeada por LPS, bem como da liberação de TNF-α, acarretando na diminuição da morte dos animais induzida pela endotoxina, choque séptico (VOGL et al., 2007). Quando os animais knockouts foram restabelecidos com a S100A8/S100A9, a susceptibilidade dos animais ao LPS voltou ao padrão normal. Adicionalmente, estudo com fagócitos obtidos de animais com receptores TLR4 não funcionais e a análise da superfície celular por *Surface Plasmon Ressonance*, que detecta alterações na superfície celular causadas pela ação de ligantes em seus receptores, demonstraram que as proteínas S100A8 e S100A9 agem como ligantes endógenos de TLR4 e, dessa maneira, amplificam a resposta inflamatória dos fagócitos ao LPS (VOGL et al., 2007).

Ainda, foi evidenciado que a proteína S100A9 tem a capacidade de degranular apenas as vesículas secretórias e os grânulos de gelatinase de neutrófilos humanos, sem interferir com os grânulos azurófilos, por um mecanismo dependente de MAPKs como a p38 e JNK (SIMARD et al., 2010). Tal evidência foi obtida pela detecção de aumento na expressão de marcadores

CD35 e CD66b, presentes na superfície de grânulos secretórios e de gelatinase, respectivamente, após o tratamento de neutrófilos com S100A9. O aumento da expressão de marcadores dos grânulos foi abolido com o pré-tratamento dos animais com inibidores de proteínas kinase p38 e JNK, demonstrando que essas proteínas participam diretamente da sinalização para degranulação induzida pela S100A9 (SIMARD et al., 2009).

Alguns trabalhos relatam a participação das proteínas S100A8 e S100A9 na supressão da resposta imune ao câncer e na progressão de tumores em diferentes modelos experimentais (CHENG et al., 2008; SINHA et al., 2008; SU et al., 2010). Assim, a regulação positiva das duas proteínas inibe a diferenciação de células dendríticas e o acúmulo de MDSC (*Myeloid-Derived Supressor Cells* - Células Supressoras Derivadas de Mielóides) em camundongos injetados com tumor ou CFA, indicando que tanto a S100A8 como a S100A9 estão envolvidas na modulação do mecanismo de supressão da resposta imune ao câncer e, assim, facilitando a carcinogênese (CHENG et al., 2008; SINHA et al., 2008).

Por outro lado, a literatura tem sugerido um papel anti-inflamatório para as proteínas S100A8 e S100A9. Nesse sentido, a injeção intraperitoneal do complexo S100A8/A9 em ratos tratados com o LPS foi efetiva em suprimir a produção de IL-6 e óxido nítrico por células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos ativados, sugerindo que o complexo pode participar da inibição indireta da resposta inflamatória exacerbada causada por substâncias oxidativas endógenas (IKEMOTO et al., 2007). Em trabalho recente, Lim et al. (2008) demonstraram que modificações oxidativas pós-transducionais da proteína S100A8 podem ser importantes para o efeito anti-inflamatório dessa proteína. Consequentemente, a S-Nitrosilação da proteína S100A8 foi capaz de inibir a degranulação *in vitro* de mastócitos, além da adesão e extravasamento de leucócitos da microcirculação de ratos induzidos pela degranulação dos mastócitos promovida pelo Composto 48/80, um degranulador específico para essas células (LIM et al., 2008). Em adição, foi demonstrado que a proteína S100A9 está presente em grandes quantidades em granulomas induzidos por carragenina em modelo “air pouch” de inflamação no dorso de ratos (SHIBATA et al., 2004). Ademais, a obtenção da proteína S100A9 do exsudato das bolsas de ar injetadas com carragenina induziu a proliferação de fibroblastos *in vitro* de maneira similar àquela observada frente ao estímulo das mesmas células com FGSF (*Fibroblast Growth-Stimulating Factor*) (SHIBATA et al., 2004). Este dado indica que a proteína S100A9 possui um papel análogo ao de um fator de crescimento para fibroblastos e, consequentemente, uma ação anti-inflamatória já que essas células participam do processo de cicatrização de granulomas (SHIBATA et al., 2004). Ainda, foi demonstrado

que a proteína S100A9 (MRP-14) está envolvida na desativação de macrófagos peritoneais ativados (AGUIAR-PASSETI et al., 1997), uma vez que a absorção da proteína do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais com anticorpo anti S100A9 aboliu a atividade do MDF (*Macrophage Deactivator Factor* - Fator de Desativação de Macrófagos) sobre essas células (AGUIAR-PASSETI et al., 1997). Foi demonstrado também que macrófagos ativados com BCG apresentam o "burst" respiratório inibido após o tratamento dessas células com S100A9 humana purificada ou recombinante (AGUIAR-PASSETI et al., 1997). Resultados recentes demonstraram que a proteína S100A9 está envolvida na supressão de macrófagos peritoneais após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, os quais produzem grandes quantidades de S100A9 (DE LORENZO et al., 2010). Dessa forma, foi observado que a incubação de macrófagos peritoneais com neutrófilos apoptóticos inibe a produção de óxido nítrico, H_2O_2 e TNF-α bem como a atividade fagocítica dos macrófagos, parâmetros que foram revertidos quando os macrófagos foram incubados com neutrófilos apoptóticos depletados de S100A9 (DE LORENZO et al., 2009). Ainda, esses autores verificaram que o tratamento da cultura de macrófagos peritoneais com o peptídeo correspondente à porção C-terminal da S100A9 induz redução dos mesmos parâmetros avaliados, indicando um papel supressor para a S100A9 sobre essas células (DE LORENZO et al., 2009).

Em complementação aos efeitos descritos acima para a proteína S100A9 isolada, nosso grupo tem demonstrado que essa proteína possui potente atividade antinociceptiva quando avaliada em camundongos submetidos à modelo de dor inflamatória (GIORGI et al., 1998). Ainda, foi demonstrado que durante a peritonite induzida pelo glicogênio, carragenina ou zimosan, os neutrófilos estão envolvidos na inibição da sensibilidade dolorosa de camundongos, em que foi sugerido que a proteína S100A9 participa da mediação desse efeito (GIORGI et al., 1998; PAGANO, 2001; PAGANO et al., 2002). Sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal após 4 ou 8 horas da injeção do glicogênio induziram efeito antinociceptivo em camundongos submetidos ao modelo das contorções abdominais (PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006). Em adição, quando foi utilizado um anticorpo monoclonal anti S100A9 para a adsorção desta proteína dos sobrenadantes, o efeito antinociceptivo observado foi revertido, sugerindo uma atividade direta da proteína S100A9 nesse efeito (PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006). Foi também demonstrado que a antinocicepção acarretada pela carragenina ou pelo zimosan, em animais submetidos ao teste das contorções abdominais, não é devido a uma ação de peptídeos opioides, uma vez que a

naloxona não interferiu com o efeito antinociceptivo induzido por esses dois agentes inflamatórios (PAGANO et al., 2002). Neste contexto, dados preliminares têm demonstrado que a injeção intraplantar de glicogênio induz antinocicepção em ratos submetidos ao teste de pressão de pata 4 horas após o tratamento. Ainda, que o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal de ratos após 4 horas da injeção do glicogênio, tempo onde foi observado um intenso infiltrado neutrofílico, além de reverter a hiperalgesia induzida pela carragenina também induz antinocicepção nesse modelo (comunicação pessoal)[1]. Dando continuidade aos estudos sobre as atividades biológicas da proteína S100A9, trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo têm avaliado o efeito de um peptídeo sintético homólogo à porção C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) em modelos distintos de avaliação da sensibilidade dolorosa (DALE, 2002; DALE et al., 2004, 2006a, b). O peptídeo do C-terminal da S100A9 murina empregado nesses estudos foi sintetizado com base na sequência de aminoácidos descrita anteriormente (HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993; RAFTERY et al., 1996). O peptídeo composto por 19 aminoácidos, corresponde às posições His^{92} – Gly^{110} da porção C-terminal da S100A9, possui uma região rica em histidina, referida como sítio ligante de zinco (RAFTERY et al., 1996), sendo essa região também ligante de ácido aracdônico (SOPALLA et al., 2002).

Assim, foi demonstrado que o pS100A9m induz antinocicepção semelhante àquela observada com a proteína total (DALE et al., 2006a). Ainda, o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida por diferentes tipos de proteases e pelo peptídeo agonista de receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR-2) em ratos avaliados no modelo de pressão de pata (DALE, 2002; DALE et al., 2004, 2006b). Mais recentemente, foi demonstrado que C-terminal da proteína S100A9 interfere com os mecanismos envolvidos na nocicepção, hiperalgesia e sinalização do cálcio em neurônios sensoriais, modulando o sinal nociceptivo nos aferentes primários por uma inibição da ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N (DALE et al., 2009). Ainda, em modelo de dor neuropática desencadeada pela constrição do nervo ciático em ratos, o pS100A9m inibe a hiperalgesia, a alodinia e a dor espontânea, sinais característicos desse tipo de dor crônica. Esses dados demonstram que o peptídeo da S100A9 possui efeito antinociceptivo tanto sobre a dor crônica quanto sobre a dor inflamatória aguda (PACCOLA et al., 2008). Com relação ao processo inflamatório especificamente, dados obtidos por Pagano et al. (2005, 2010) demonstraram que o pS100A9m inibe o espraiamento e a fagocitose por células peritoneais aderentes de camundongos, tanto quiescentes quanto estimuladas com agonistas de receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1), sugerindo que esse peptídeo

[1] Informações fornecidas por NOGUEIRA, T. O.; GIORGI, R. em fevereiro de 2008

também atua inibindo alguns parâmetros celulares da resposta inflamatória.

♣

♣ ♣

Os estudos descritos acima evidenciam claramente que os neutrófilos estão envolvidos com a modulação da resposta dolorosa durante o processo inflamatório. Entretanto, sua ação ainda é discutível, uma vez que os trabalhos de literatura relatam que essas células podem participar tanto do desencadeamento da dor na fase aguda da resposta inflamatória, quanto da inibição desse fenômeno. Ainda, pouco se sabe a respeito da relação entre a migração neutrofílica e a expressão da proteína S100A9 durante a antinocicepção observada em modelos de inflamação aguda. Desta maneira, maiores investigações são necessárias para melhor compreender a função do neutrófilo na gênese da dor inflamatória, bem como qual a participação da proteína S100A9 na mediação do efeito antinociceptivo observado após a migração neutrofílica em modelo de inflamação induzida pelo glicogênio.

Objetivo

2. OBJETIVO

Considerando o importante papel do neutrófilo na fisiopatologia da inflamação, além dos trabalhos que divergem sobre a função dessas células na gênese da dor inflamatória, o objetivo geral do presente trabalho é aprofundar os estudos a respeito da atividade do neutrófilo no controle da nocicepção aguda e da participação da proteína S100A9 nesse efeito. Ainda, com base nas observações prévias de que a injeção intraplantar de glicogênio induz antinocicepção em ratos submetidos ao teste de pressão de pata 4 horas após o tratamento, bem como que esse efeito também foi detectado com o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção intraperitoneal do irritante sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina, os objetivos específicos são:

- ✓ Determinar o tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pela injeção intraplantar do glicogênio em ratos avaliados no teste de pressão de pata;
- ✓ Avaliar a participação dos neutrófilos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio pelo tratamento dos animais com fucoidina;
- ✓ Analisar histologicamente o coxim plantar dos animais pré-tratados ou não com fucoidina e injetados com glicogênio;
- ✓ Avaliar a participação de peptídeos opioides no efeito antinociceptivo induzido pela injeção intraplantar do glicogênio pelo tratamento dos animais com naloxona;
- ✓ Detectar e quantificar relativamente à expressão da proteína S100A9, por "Western Blotting", no tecido plantar dos animais em diferentes tempos após a administração do glicogênio;
- ✓ Determinar a cinética de migração celular após a injeção intraperitoneal de glicogênio;
- ✓ Avaliar o efeito de sobrenadantes obtidos dos exsudatos peritoneais em diferentes tempos após a injeção intraperitoneal do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina, e
- ✓ Determinar a participação da proteína S100A9 no efeito antinociceptivo observado com o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia da carragenina.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 170 e 190g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos em local apropriado, com temperatura controlada (22 ± 2°C), ciclo claro e escuro (12/12 horas), com livre acesso à água e ração por um período mínimo de três dias antes de serem utilizados nos experimentos. Os procedimentos experimentais com animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animas do Instituto Butantan (Protocolo 529/08)

3.2 Indução da resposta inflamatória.

3.2.1 Glicogênio (Gli)

A solução de glicogênio extraído de ostra (Tipo II, Sigma), preparada a 5% em salina estéril, foi inoculada por via intraplantar num volume final de 100µL/animal. Após 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas do tratamento os animais foram avaliados no teste nociceptivo. Animais injetados com salina estéril, nas mesmas condições de tratamento que o glicogênio, foram utilizados como grupo controle. Ainda, ratos anestesiados com solução composta por xilasina e quetamina (proporção 1:1) foram inoculados pela via intraperitoneal com 10mL de solução de glicogênio a 1% preparado em salina estéril e após 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas foram eutanasiados para a coleta do exsudato peritoneal. Grupos de animais injetados com salina estéril, nas mesmas condições de tratamento que o grupo inoculado com glicogênio, foram utilizados como controle.

3.2.2 Carragenina (Cg)

A hiperalgesia inflamatória foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina - (Sigma) na proporção de 200 µg/pata. O teste nociceptivo foi aplicado 3 horas após os tratamentos, tempo equivalente ao pico de hiperalgesia induzida pela Cg no modelo de pressão de pata de ratos.

3.3 Tratamentos

3.3.1 Fucoidina

A inibição da migração neutrofílica foi realizada pelo tratamento com fucoidina (Sigma), um inibidor de selectinas. A fucoidina foi dissolvida em salina estéril e injetada pela via endovenosa, na dose de 5mg/kg em um volume de 500µL, 15 minutos antes da injeção intraplantar do glicogênio a 5%.

3.3.2 Naloxona

A participação de peptídeos opioides foi avaliada pelo tratamento dos animais com naloxona (Rhodia, Brasil), antagonista inespecífico de receptores opioides. A naloxona foi preparada em salina estéril e injetada pela via subcutânea, na dose de 1mg/kg em um volume de 100µL/animal, 15 minutos antes da realização do teste de pressão de pata em animais injetados previamente com o glicogênio (5%, 100µL/pata). Em outro protocolo experimental, a naloxona foi administrada pela via intraplantar, na mesma dose, porém em um volume de 50µL/pata, 15 minutos antes da injeção do glicogênio. Para a realização desse experimento o glicogênio preparado a 5% foi injetado num volume de 50µL/pata.

3.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais foi utilizado o teste de pressão de pata de ratos (Analgesic-Meter Hugo Basile®, Itália), realizado de acordo como método descrito por RANDALL; SELITTO, 1957.

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato. O teste é interrompido quando o animal apresenta a reação de "retirada" da pata pressionada. O limiar de dor é representado como a força, em gramas, necessária para a indução da reação. O teste foi aplicado antes do início dos tratamentos (medida inicial) e em diferentes tempos (medida final) após a injeção do glicogênio.

Os resultados foram analisados pela comparação entre as médias das medidas iniciais e finais ou comparando-se as médias das medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.5 Processamento dos coxins plantares de ratos para análise histológica

3.5.1 Coleta do material

Animais pré-tratados ou não com fucoidina foram injetados com 100µL de solução de glicogênio a 5% pela via intraplantar e após 2, 4, 8, 12 e 24 horas foram eutanasiados em câmara de CO_2 para a remoção dos coxins das patas tratadas. Os coxins das patas contralaterais de animais dos grupos experimentais e de ratos injetados com 100µL de salina, pela via intraplantar, foram utilizados como controles.

3.5.2 Técnica de H/E

Os coxins plantares dos animais foram fixados em Bouin, desidratados em

concentrações crescentes de etanol (70 a 100%), diafanizados em xilol e, posteriormente, incluídos em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais das peças, com aproximadamente 5µm de espessura. Após a desparafinação e hidratação, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e, em seguida, desidratados e montados com resina sintética (Entellan). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz Leica DMLB pelo programa Leica Application Suite V3.1.0. e o registro fotográfico realizado por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio.

3.6 Avaliação semiquantitativa das células polimorfonucleares migradas para o coxim plantar

A avaliação semiquantitativa das células polimorfonucleares migradas para o tecido conjuntivo do coxim plantar dos ratos após a injeção do glicogênio, na presença ou não do tratamento com a fucoidina, foi realizada de acordo com o trabalho descrito por Lavich et al., (2006). Dessa forma, ratos foram tratados com fucoidina 15 minutos antes da injeção de glicogênio ou apenas com glicogênio e após 2, 4, 8 e 12 horas foram eutanasiados em câmara de CO_2, o tecido plantar coletado e processado para análise histológica de acordo com o item 3.5.2 Para a avaliação semiquantitativa das células PMNs, os cortes foram analisados no aumento de 1000X em microscópio de luz e a contagem de PMNs foi realizada, de forma aleatória, em cinquenta campos do tecido conjuntivo. O valor médio dos cinquenta campos foi tomado como valor representativo do número de células migradas para o tecido inflamado em cada tempo avaliado. Essa contagem foi realizada em 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo.

3.7 Detecção da proteína S100A9 no coxim plantar dos animais após a injeção de glicogênio – "Western Blotting"

Inicialmente, os animais injetados pela via intraplantar com glicogênio foram eutanasiados em câmara de CO_2 em diferentes tempos e o tecido do coxim plantar removido, cortado em pequenos pedaços e homogeneizado em tampão CTAB a 0,5%. Após

centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e o conteúdo protéico dosado pelo método do Ácido bicinconínico (BCA) (SMITH et al., 1985). As amostras, então, foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Para tanto, os sobrenadantes foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125mM, pH 6,8, contendo SDS (2,5%), 2-mercaptoetanol (2-ME) 2,5% (v/v) e azul de bromofenol (0,05%), e posteriormente fervidas em banho-maria por 7 minutos. As amostras reduzidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% utilizando-se corrente constante de 25mA (LAEMMLI, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, 0,2µm de diâmetro) em uma cuba de transferência semisseca (BioRad) por 1 hora e trinta minutos a 10 volts (HARLOW; LANE, 1988). Após bloqueio com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em solução de PBS e Tween-20 a 0,1% (solução de lavagem) durante 18 h, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal para a proteína S100A9 humana (ab75478 – Abcam) diluído 1:3000 em solução bloqueadora, por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário anticoelho (IgG) conjugado com peroxidase (A-0545 – Sigma Aldrich) diluído 1:5000 em solução bloqueadora. O excesso de conjugado foi removido com três ciclos de lavagens. A revelação foi realizada utilizando solução cromógena composta por tampão imidazol 0,1M, diaminobenzidina a 0,05%, cloreto de cobalto 0,2M e água oxigenada 100 vol. a 30% (PUKAC et al., 1997). Após a revelação, as membranas foram escaneadas com resolução de 600 dpi (extensão TIFF) em um escâner Image ScannerIII (G.E.). Para a quantificação relativa da S100A9, as proteínas totais presentes nas raias foram coradas com nanquim (HARLOW; LANE, 1988) e igualmente escaneadas. A intensidade relativa de S100A9 foi analisada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics. Primeiramente, obteve-se o "volume" (área × intensidade de pixels) de cada banda de S100A9 marcada, que foi dividido pelo respectivo "volume" total de proteína aplicada em cada raia. A expressão relativa da banda de S100A9 marcada foi realizada pela comparação com os valores obtidos normalizados para os animais injetados com salina.

3.8 Contagem total e diferencial de leucócitos e obtenção dos sobrenadantes dos exsudatos inflamatórios.

Os animais injetados pela via intraperitoneal com solução de glicogênio a 1% ou salina estéril foram eutanasiados em câmara de CO_2 após 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas dos tratamentos. Em seguida os animais tiveram a cavidade abdominal lavada com 10mL de salina estéril e o fluido peritoneal coletado com uma pipeta Pasteur, ficando em banho de gelo até o momento da contagem. As células foram coradas com cristal violeta a 5%, para determinação do número total de células em hemocitômetro de Neubauer e do diferencial com auxílio do microscópio óptico (Zeiss, 1000x). Os exsudatos coletados individualmente foram submetidos à centrifugação por duas vezes a 1000 rpm, a 5º C por 10 minutos. Em seguida, os pellets celulares foram desprezados e os sobrenadantes reunidos em uma única amostra correspondente a cada tempo, tanto para o grupo salina quanto para o grupo tratado com glicogênio, sendo aliquotados e congelados a –80º C para posterior avaliação sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina em animais submetidos ao teste de pressão de pata.

3.9 Injeção intraplantar concomitante dos sobrenadantes obtidos do exsudato inflamatório com a carragenina.

Para avaliação do efeito da injeção intraplantar dos sobrenadantes, provenientes do exsudato peritoneal após a injeção do glicogênio, sobre a hiperalgesia inflamatória, a carragenina (200µg/pata) foi diluída em 100µL de cada amostra do sobrenadante obtido nos tempos de 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento com glicogênio. Assim, esta solução foi administrada num volume de 100µL/pata e o teste de pressão de pata aplicado 3 horas após os diferentes tratamentos. O mesmo procedimento foi realizado com os sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal de ratos injetados com salina (grupo controle). Animais injetados pela via intraplantar com carragenina (200µg/100µL de salina estéril) também foram avaliados como grupo controle.

3.10 Tratamento *in vitro* do sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio com o anticorpo anti S100A9

Com o objetivo de determinar a participação da proteína S100A9 no efeito antinociceptivo induzido pelo sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia da carragenina, esse sobrenadante foi incubado por 1 hora a 4ºC com o anticorpo policlonal para a proteína S100A9 humana (ab75478 – Abcam) na proporção de 2:1, totalizando 100µL de solução de sobrenadante/anticorpo. Após esse período, a carragenina (200µg/pata) foi diluída na solução de sobrenadante/anticorpo e injetada nos animais via intraplantar em um volume final de 100µL. O teste de pressão de pata foi aplicado 3 horas após o tratamento dos animais, pico de hiperalgesia da carragenina. O sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção de salina foi submetido ao mesmo tratamento e avaliado como controle. Animais injetados com carragenina (200µg/pata) diluída nos sobrenadantes obtidos após a injeção de salina ou glicogênio sem o tratamento com o anticorpo anti S100A9 e animais injetados apenas com carragenina (200µg/pata) diluída em salina também foram utilizados como controle.

3.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m) e analisados estatisticamente por ANOVA de uma ou duas vias ou Teste "t" de Student. O teste de Tukey foi utilizado para detectar as diferenças das médias após a Análise de Variância (SNEDECOR, 1956; SNEDECOR; COCHRAN, 1974). O índice de significância considerado foi de $p<0,05$, calculado com software GraphPad Instat tm/GraphPad Software V2.01-Copyright ©, 1990-1993. O Teste "t" foi empregado para a análise dos experimentos de histologia e "Western blotting", a ANOVA de duas vias foi utilizada para avaliar o tempo de duração do efeito da injeção intraplantar do glicogênio e da ação da fucoidina ou da naloxona sobre esse efeito, e os demais experimentos analisados por ANOVA de uma via.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos avaliados no teste de pressão de pata

Com o objetivo de determinar o tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pela injeção intraplantar de glicogênio em animais submetidos ao teste de pressão de pata, ratos foram tratados com solução de glicogênio a 5% (100µL/pata) e após diferentes tempos avaliados no teste nociceptivo. Os resultados obtidos demonstraram que o glicogênio não alterou a sensibilidade dolorosa dos animais 1 e 24 horas após o tratamento em comparação com o grupo controle, animais injetados apenas com salina. Contudo, quando o teste de pressão de pata foi aplicado 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas após o tratamento com glicogênio, foi observado um aumento no limiar nociceptivo tanto em relação ao grupo controle quanto a medida inicial, demonstrando um efeito antinociceptivo nesse intervalo de tempo **(Figura 1)**.

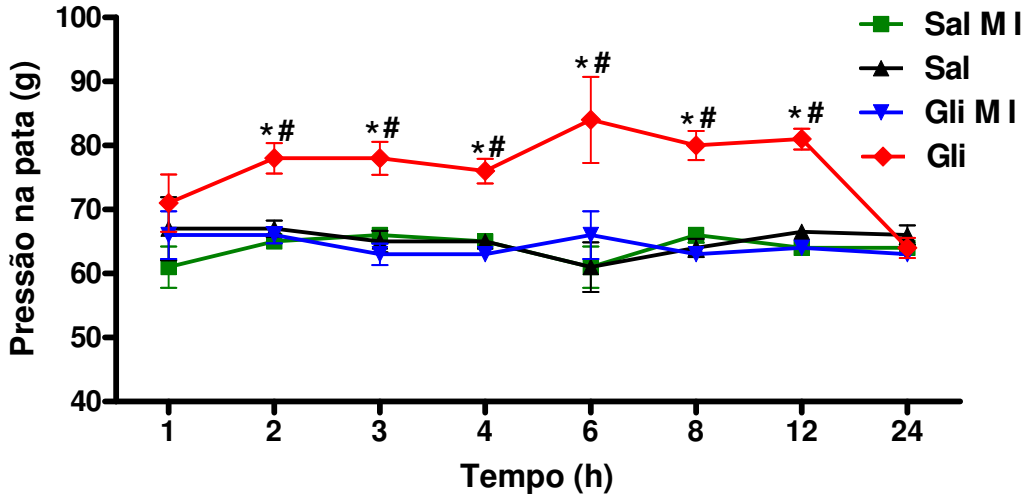

Figura 1 - Tempo de duração do efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao teste de pressão de pata. Animais injetados pela via intraplantar com glicogênio (Gli) a 5% (100µL/pata) ou salina (Sal) no mesmo volume, grupo controle, foram avaliados no teste de pressão de pata antes (MI) e após diferentes tempos dos tratamentos. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo em cada tempo indicado. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI); #p<0,05 em relação ao grupo de animais injetado com salina.

4.2 Participação dos neutrófilos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio

Com o intuito de avaliar a participação dos neutrófilos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio, animais foram tratados com fucoidina, um inibidor de selectinas, via endovenosa na dose de 5mg/kg (500µL/animal) ou salina 15 minutos antes da injeção intraplantar de glicogênio (5%, 100µL/pata) e em diferentes tempos submetidos ao teste de pressão de pata. O pré-tratamento dos animais com fucoidina não só reverteu a antinocicepção acarretada pelo glicogênio como também induziu hiperalgesia 2, 4 e 6 horas após a injeção do agente inflamatório. Após 8 horas da injeção do glicogênio, a fucoidina apenas reverteu a antinocicepção observada, não sendo mais detectada a ação desse inibidor sobre o efeito induzido pelo glicogênio nos tempos de 12 e 24 horas após sua administração **(Figura 2)**.

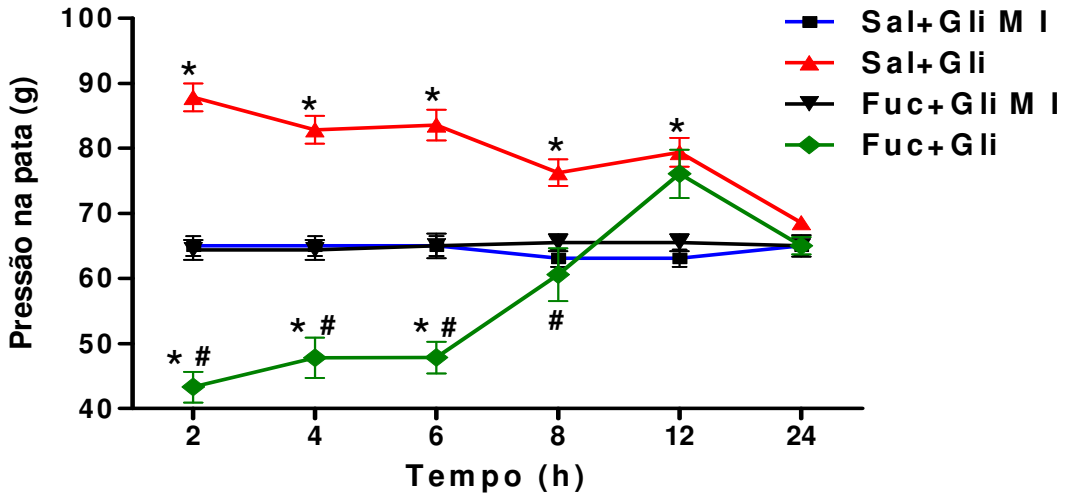

Figura 2 - Efeito do pré-tratamento com fucoidina sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio. A fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg ou salina (Sal+Gli), 500µL/animal, foram administradas pela via endovenosa 15 minutos antes da injeção intraplantar do glicogênio (5%, 100µL/pata). O teste nociceptivo foi aplicado antes (MI) e em diferentes tempos após o tratamento dos animais com o glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo em cada tempo indicado. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI); #p<0,05 em relação ao grupo de animais tratado apenas com salina e glicogênio.

4.3 Análise histológica do coxim plantar de animais injetados com glicogênio pré-tratados ou não com fucoidina e avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares migradas

A fim de caracterizar o perfil de células migradas para o tecido conjuntivo da pata de ratos tratados com fucoidina (5mg/kg) ou salina 15 minutos antes da injeção intraplantar de glicogênio a 5%, os coxins plantares dos animais foram coletados após diferentes tempos do último tratamento e processados para a realização da análise histológica. Em linhas gerais, foi observado que a injeção intraplantar de glicogênio induziu um infiltrado leucocitário que foi aumentando com o decorrer do tempo até a décima segunda hora após o tratamento, caracterizado pela presença de células polimorfonucleares no tecido conjuntivo da pata dos animais, principalmente entre 4 e 8 horas após a administração do agente inflamatório. O pré-tratamento dos animais com fucoidina inibiu a migração de células polimorfonucleares entre 2 e 8 horas após a injeção de glicogênio, sendo que na décima segunda hora após esse tratamento o efeito da fucoidina não foi mais evidenciado. Os controles foram compostos pelo grupo branco, patas contralaterais dos animais do grupo experimental, ou grupo salina, coxins de animais injetados apenas com salina via intraplantar nas mesmas condições que o glicogênio. Em relação aos controles, foi observado que a injeção de salina não causou alterações morfológicas significativas em nenhum dos tempos avaliados, quando comparada com o grupo branco. A **figura 3** é representativa dos grupos controles e demonstra a morfologia do tecido conjuntivo do coxim plantar de um animal branco (figura 3A) e de outro injetado 12 horas antes com salina (figura 3B).

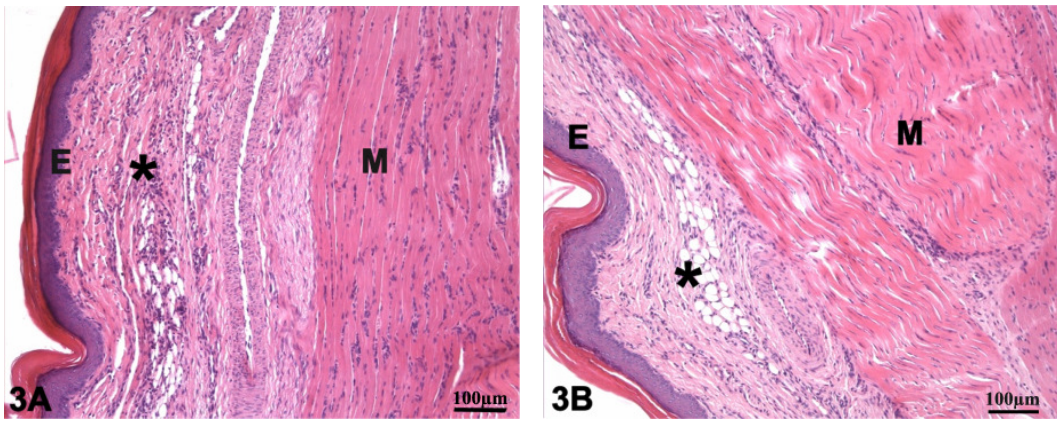

Figura 3 - Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar de animais dos grupos controles. **3A –**Vista geral do tecido conjuntivo da pata contralateral obtido após 12 horas da injeção do glicogênio (grupo branco). **3B –**Tecido conjuntivo do coxim plantar obtido após 12 horas da injeção de 100µL de salina estéril. **E** – epitélio; **M** – tecido muscular; ***** – tecido conjuntivo.

A análise histológica detalhada, ao longo do tempo, dos cortes dos coxins demonstrou que após 2 horas da injeção do glicogênio a maioria das células polimorfonucleares está presente na luz de vasos, evidenciando o processo de transmigração dessas células. Além disso, também foram encontradas algumas células livres no tecido conjuntivo (**Figura 4A**). Nesse mesmo tempo, a análise dos coxins de animais pré-tratados com fucoidina demonstrou ausência de células polimorfonucleares na luz dos vasos e, ainda, praticamente não foram observadas células migradas no tecido conjuntivo, evidenciando que essa droga inibiu o fenômeno da transmigração dos polimorfonucleares (**Figura 4B**). A avaliação semiquantitativa das células polimorfonucleares presentes no tecido conjuntivo plantar após 2 horas da injeção do glicogênio, em animais pré-tratados ou não com fucoidina, demonstrou que não houve diferença entre o número de células migradas entre os dois grupos (**Figura 5**).

Em relação ao tempo de 4 horas após a injeção de glicogênio, foi observado um aumento expressivo do infiltrado leucocitário no tecido conjuntivo, formado predominantemente por células polimorfonucleares (**Figura 6A, 7**). Por outro lado, a fucoidina induziu uma redução significativa na quantidade dessas células presentes no tecido conjuntivo plantar, em comparação com o grupo glicogênio, como observado nas **figuras 6B e 7**. A contagem de células polimorfonucleares migradas, nesse tempo de tratamento, para o tecido conjuntivo plantar dos animais injetados com glicogênio demonstrou um aumento significativo em relação ao tempo de 2 horas (**Figura 12**).

Na oitava hora após a injeção de glicogênio, apesar do predomínio de células polimorfonucleares no coxim plantar dos animais, já foi possível observar a presença de células mononucleares migradas para o tecido inflamado (**Figura 8A**). O pré-tratamento com a fucoidina induziu novamente uma inibição da migração de células polimorfonucleares para o tecido conjuntivo plantar, semelhante ao que foi observado com o tempo de 4 horas (**Figura 8B**). O infiltrado mononuclear também foi menos intenso quando comparado com o grupo glicogênio. A **figura 9** mostra a semiquantificação das células polimorfonucleares migradas nesse tempo de tratamento, em que foi observado que a inibição induzida pela fucoidina ainda é significativa quando comparada com os animais injetados com o glicogênio.

Os resultados obtidos após 12 horas da injeção de glicogênio demonstraram que mesmo sendo o infiltrado leucocitário bastante intenso, foi detectada uma redução acentuada da quantidade de células polimorfonucleares migradas e um aumento de células mononucleares presentes no tecido conjuntivo quando comparado com os tempos anteriores (**Figura 10A**). Com relação ao grupo pré-tratado com fucoidina, foi verificado que o padrão de migração de células polimorfonucleares e mononucleares é similar ao do grupo de animais

tratados apenas com o glicogênio (**Figura 10B**). A contagem de células após 12 horas dos tratamentos demonstrou que não foi mais detectada a redução significativa do número de polimorfonucleares migrados para o tecido conjuntivo dos animais pré-tratados com fucoidina quando comparado com os ratos tratados apenas com o glicogênio (**Figura 11**).

A **figura 12** demonstra o perfil de migração de células polimorfonucleares para o tecido plantar de animais pré-tratados com salina ou fucoidina 15 minutos antes da injeção intraplantar do glicogênio, em que fica clara a diferença significativa ao longo do tempo tanto no aumento da quantidade de células migradas no grupo salina mais glicogênio, quanto na atividade inibitória da fucoidina sobre esse efeito.

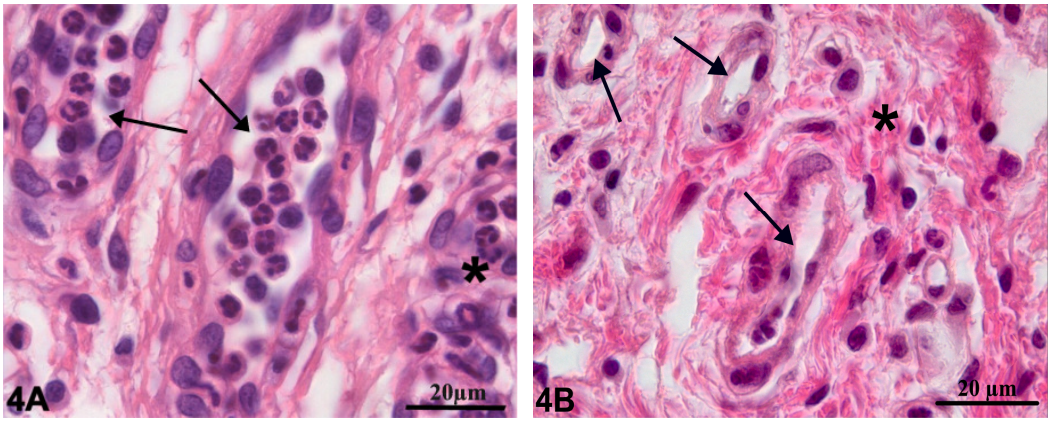

Figura 4 – Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 2 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina. **4A** - Detalhe de parte do tecido conjuntivo do coxim de um animal pré-tratado com salina e injetado com glicogênio, em que é possível notar a presença de células polimorfonucleares principalmente na luz dos vasos (**setas**) e algumas células livres no tecido (*). **4B** – Coxim plantar de rato pré-tratado com fucoidina, demonstrando ausência de polimorfonucleares na luz dos vasos (**setas**) e tecido conjuntivo praticamente sem infiltrado celular (*).

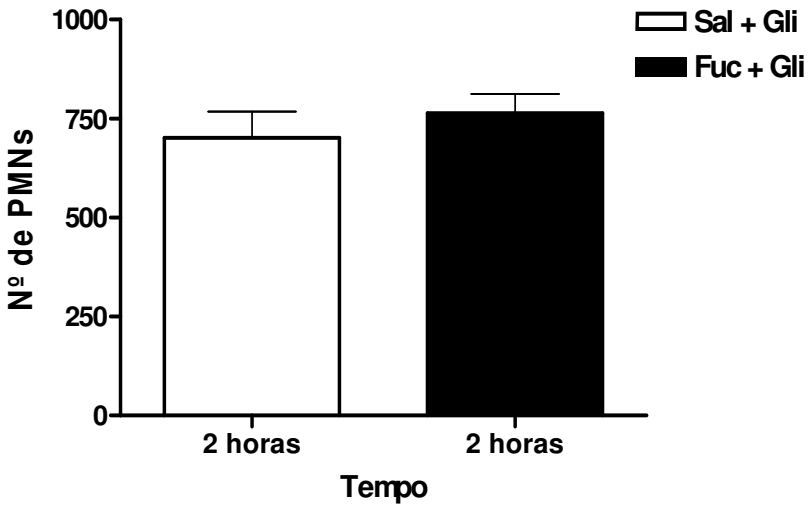

Figura 5 – Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 2 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina. O glicogênio a 5% (100µL/pata) foi injetado em ratos pré-tratados com salina (Sal+Gli) ou fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg pela via endovenosa. A contagem de células foi realizada aleatoriamente em 50 campos distintos de cada corte. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo.

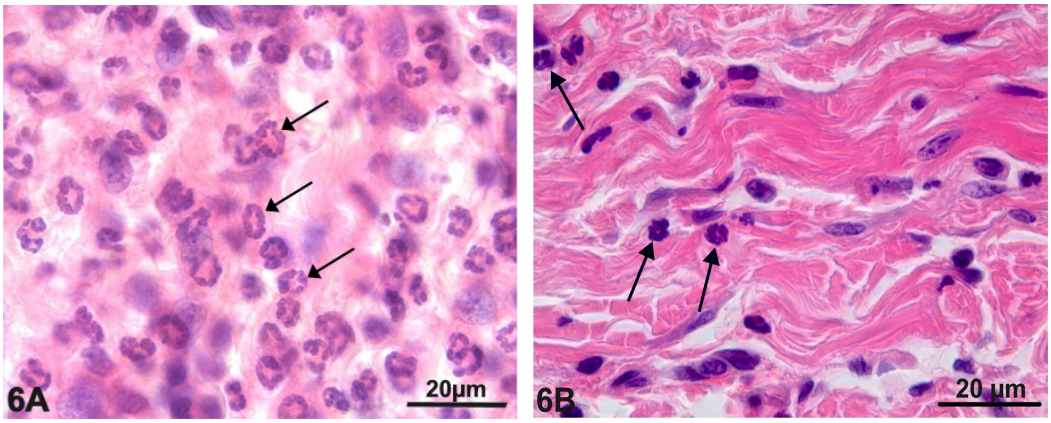

Figura 6 – Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 4 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina. **6A–** Detalhe de parte do tecido conjuntivo do coxim de um animal pré-tratado com salina e injetado com glicogênio, destacando o infiltrado leucocitário composto predominantemente por células polimorfonucleares (**setas**). **6B** - Coxim plantar de rato pré-tratado com fucoidina demonstrando que existem pucas células polimorfonucleares no tecido conjuntivo (**setas**).

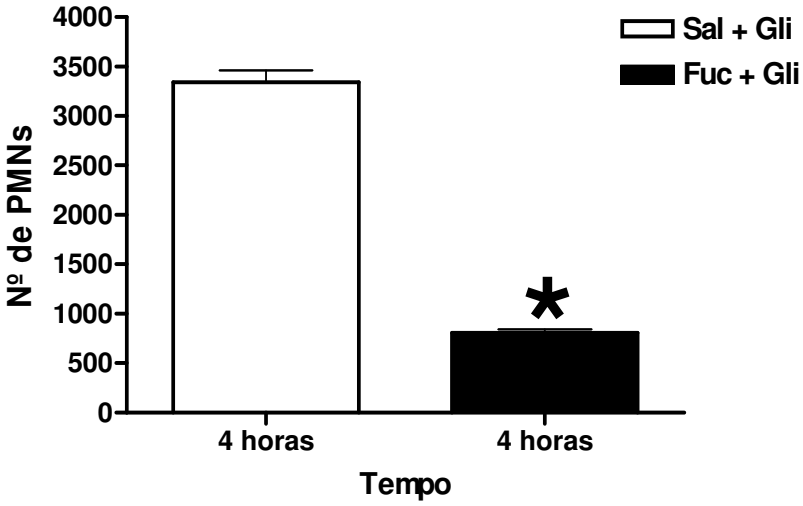

Figura 7 - Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 4 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina. O glicogênio a 5% (100µL/pata) foi injetado em ratos pré-tratados com salina (Sal+Gli) ou fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg pela via endovenosa. A contagem de células foi realizada aleatoriamente em 50 campos distintos de cada corte. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo salina mais glicogênio.

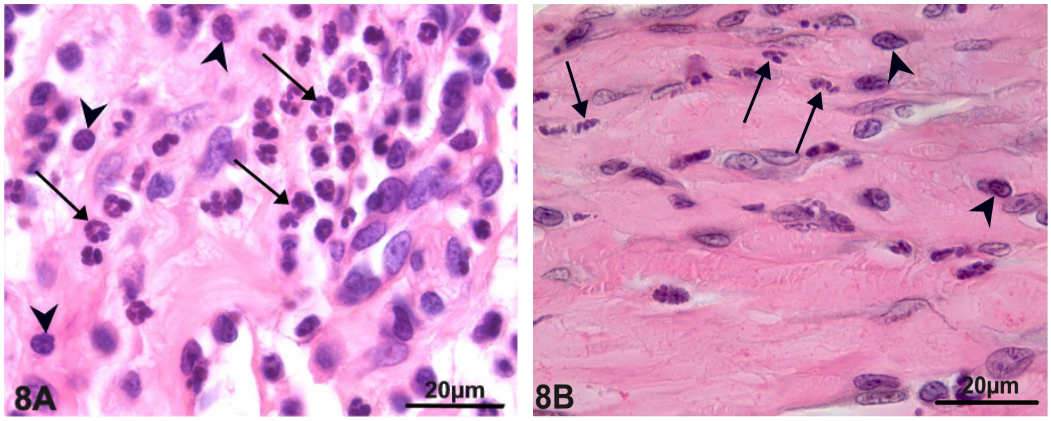

Figura 8 – Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 8 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina. **8A** – Tecido conjuntivo do coxim de um animal pré-tratado com salina e injetado com glicogênio, evidenciando a presença de células polimorfonucleares (**setas**) e algumas células mononucleares no tecido inflamado (**cabeças de setas**). **8B** - Detalhe de parte do tecido conjuntivo de rato pré-tratado com fucoidina, em que é possível notar a presença de células mononucleares (**cabeças de setas**) em meio às poucas células polimorfonucleares (**setas**).

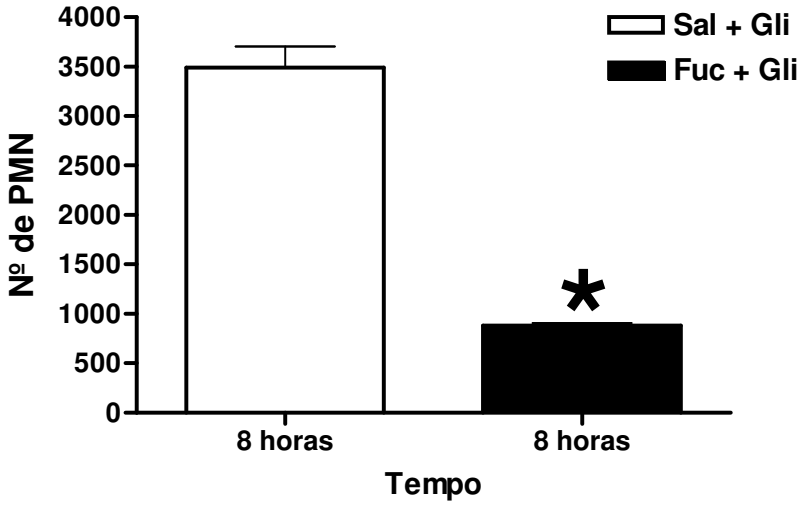

Figura 9 - Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 8 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina. O glicogênio a 5% (100µL/pata) foi injetado em ratos pré-tratados com salina (Sal+Gli) ou fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg pela via endovenosa. A contagem de células foi realizada aleatoriamente em 50 campos distintos de cada corte. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo com salina mais glicogênio.

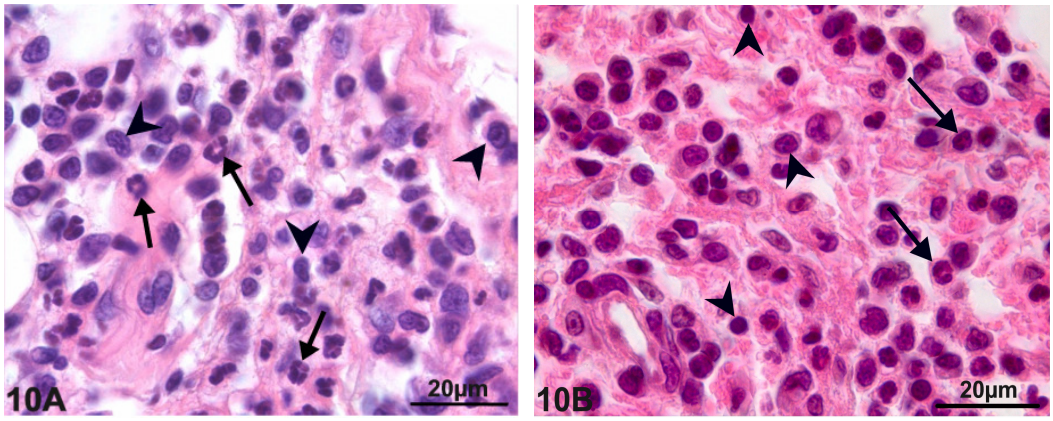

Figura 10 – Fotomicrografias de corte histológico do coxim plantar obtido após 12 horas da injeção de glicogênio em animais pré-tratados com salina ou fucoidina. **10A** - Detalhe do tecido conjuntivo do coxim de um animal pré-tratado com salina e injetado com glicogênio demonstrando a presença tanto de células polimorfonucleares (**setas**) quanto de mononucleares (**cabeças de setas**). **10B** - Tecido conjuntivo de rato pré-tratado com fucoidina em que as células polimorfonucleares (**setas**) e mononucleares (**cabeças de setas**) estão presentes em proporções equivalentes no tecido inflamado.

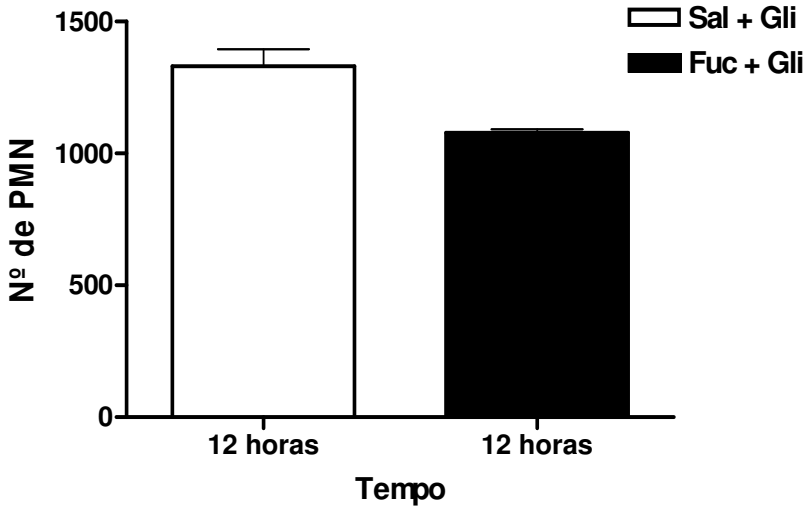

Figura 11 - Avaliação semiquantitativa de células polimorfonucleares presentes no coxim plantar obtido após 12 horas da injeção de glicogênio em ratos pré-tratados com salina ou fucoidina. O glicogênio a 5% (100µL/pata) foi injetado em ratos pré-tratados com salina (Sal+Gli) ou fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg pela via endovenosa. A contagem de células foi realizada aleatoriamente em 50 campos distintos de cada corte. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo.

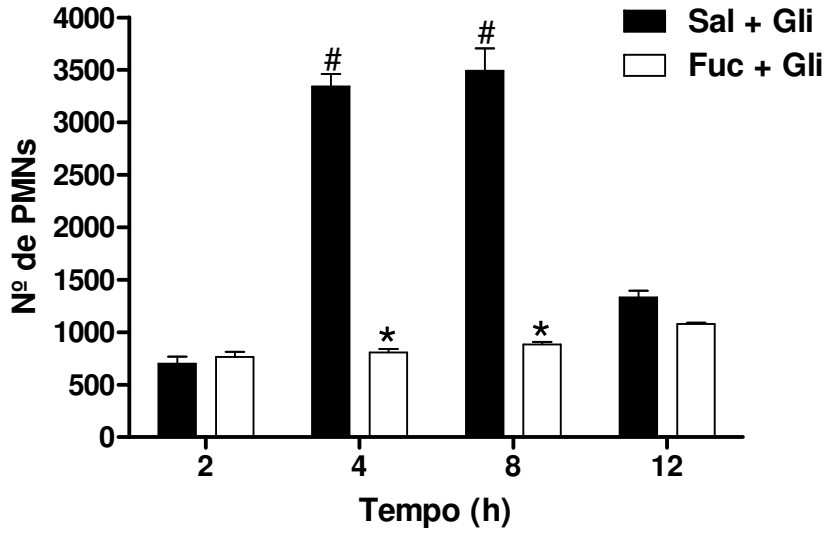

Figura 12 - Avaliação semiquantitativa ao longo do tempo de células polimorfonucleares migradas para o coxim plantar de animais pré-tratados com salina ou fucoidina e injetados com o glicogênio. O glicogênio a 5% (100µL/pata) foi injetado em ratos pré-tratados com salina (Sal+Gli) ou fucoidina (Fuc+Gli) na dose de 5mg/kg pela via endovenosa e os coxins coletados em diferentes tempos. A contagem de células foi realizada aleatoriamente em 50 campos distintos de cada corte. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 3 cortes não seriados do coxim plantar de 3 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo salina mais glicogênio para cada tempo avaliado; #p<0,05 em comparação com o tempo de 2 horas do grupo Sal+Gli.M

4.4 Avaliação da participação de peptídeos opioides no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio

Para avaliar se os peptídeos opioides endógenos participam da resposta antinociceptiva induzida pelo glicogênio animais foram tratados com naloxona em dois protocolos distintos. A ação sistêmica da naloxona (1mg/kg, 100µL/animal) foi investigada pela sua administração via subcutânea, 15 minutos antes da realização do teste nociceptivo, em animais previamente injetados na pata com glicogênio (5%, 100µL/pata). Para a avaliação de sua ação local, a naloxona (1mg/kg, 50µL/pata) foi administrada 15 minutos antes da injeção do glicogênio (5%, 50µL/pata). Em ambos os protocolos, o teste de pressão de pata foi aplicado 2, 3 e 4 horas após o tratamento com o glicogênio. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o tratamento sistêmico (**Figura 13**) quanto o tratamento local (**Figura 14**) com a naloxona não interferiu com o efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio, em nenhum dos tempos avaliados.

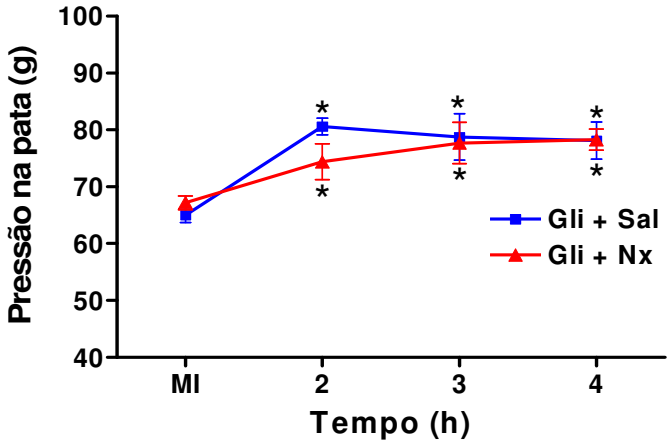

Figura 13 – Efeito da injeção subcutânea de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio. A naloxona (1mg/kg, 100µL/animal) foi administrada 15 min antes da realização do teste nociceptivo em animais previamente injetados pela via intraplantar com o glicogênio (5%, 100µL/animal). O teste de pressão de pata foi aplicado antes dos tratamentos (MI) e após 2, 3 e 4 horas da injeção do glicogênio. Animais injetados com glicogênio e salina (Gli+Sal), nas mesmas condições do grupo tratado com naloxona (Gli+Nx), foram utilizados como controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo em cada tempo indicado. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI).

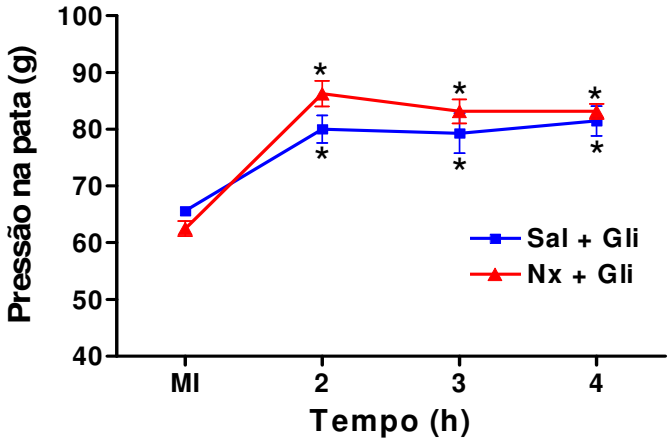

Figura 14 - Efeito da injeção intraplantar de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo glicogênio. A naloxona (1mg/kg, 50µL/pata) foi administrada 15 min antes da injeção intraplantar do glicogênio (5%, 100µL/pata) e o teste de pressão de pata aplicado antes (MI) e 2, 3 e 4 horas após o último tratamento. Animais injetados com salina e glicogênio (Sal+Gli), nas mesmas condições do grupo tratado com naloxona (Nx+Gli), foram utilizados como controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo em cada tempo indicado. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI).

4.5 Detecção por "Western Blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 no sobrenadante obtido do tecido do coxim plantar dos animais tratados com salina ou glicogênio

Para verificar a expressão da proteína S100A9 no tecido plantar de ratos injetados com salina ou glicogênio, os animais tiveram as patas removidas, processadas e os sobrenadantes obtidos dessas amostras foram analisados por Western blotting empregando-se anticorpo policlonal antiS100A9. Ainda, após a analise das amostras foi realizada a quantificação relativa da proteína S100A9 expressa no coxim plantar dos animais de ambos os grupos.

Os resultados demonstraram que houve uma marcação intensa de uma banda com peso molecular aproximado de 14 kDa em todas as amostras dos sobrenadantes obtidos após 2, 4, 8, 12 e 24 horas da injeção do glicogênio (**Figuras 15A, 16A, 17A, 18A e 19A**). Ainda, a proteína marcada tem um peso que corresponde à massa molecular da S100A9. Algumas amostras de salina também apresentaram uma banda marcada na mesma altura que as amostras obtidas dos animais injetados com o glicogênio (14 kDa), porém com uma intensidade significativamente menor. Ainda, em todas as amostras de ambos os grupos foi detectada a presença de uma banda marcada inespecificamente com peso aproximada de 40 kDa (**Figuras 15A, 16A, 17A, 18A e 19A**). A quantificação da proteína S100A9 nas bandas marcadas demonstrou um aumento significativo da expressão dessa proteína entre os tempos de 2 e 12 horas nos grupos tratados com glicogênio em comparação com os grupos tratados com salina, com pico observado 4 horas após o tratamento (**Figuras 15B, 16B, 17B e 18B**). Entretanto, no tempo de 24 horas, apesar da marcação da S100A9 ser mais intensa no grupo tratado com glicogênio quando comparado ao grupo salina, não foi mais observada diferença significativa da quantidade relativa dessa proteína entre os dois grupos (**Figura 19B**). A **figura 20** demonstra a quantificação relativa da banda de 14 kDa ao longo do tempo nas amostras coletadas após a injeção de salina ou glicogênio, em que a maior expressão da proteína S100A9 foi detectada 4 e 8 horas após o tratamento com o agente inflamatório.

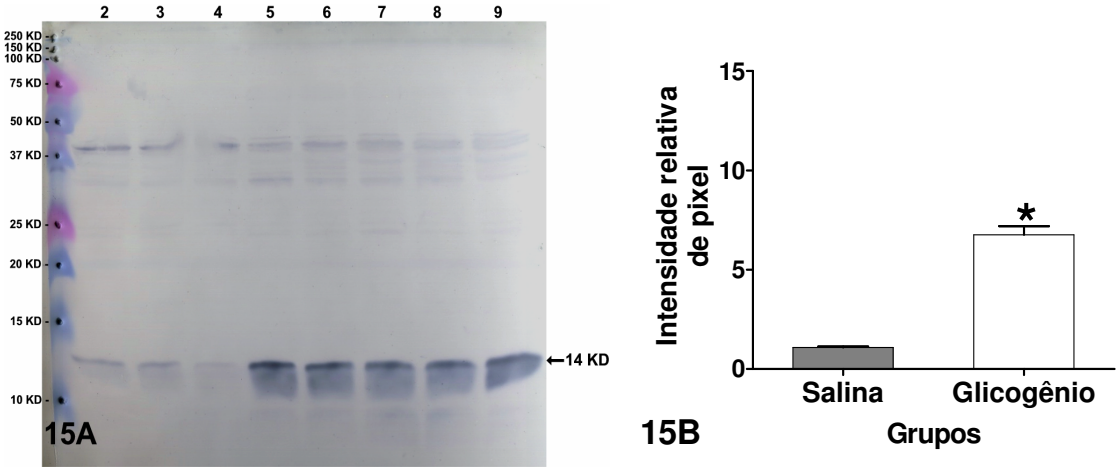

Figura 15 – "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 2 horas após a injeção de salina ou glicogênio. **15A** – Membrana de nitrocelulose demonstrando a marcação com o anticorpo policlonal anti S100A9da banda com massa molecular aproximada a 14 kDa. Poços de 2 a 4 correspondem às amostras de patas tratadas com salina. Poços de 5 a 9 correspondem às amostras de patas tratadas com glicogênio. **15B –** Quantificação relativa da banda de 14 kDa marcada com o anticorpo policlonal anti S100A9em amostras obtidas das patas de ratos após 2 horas da injeção intraplantar de salina ou glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 3 a 5 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

.

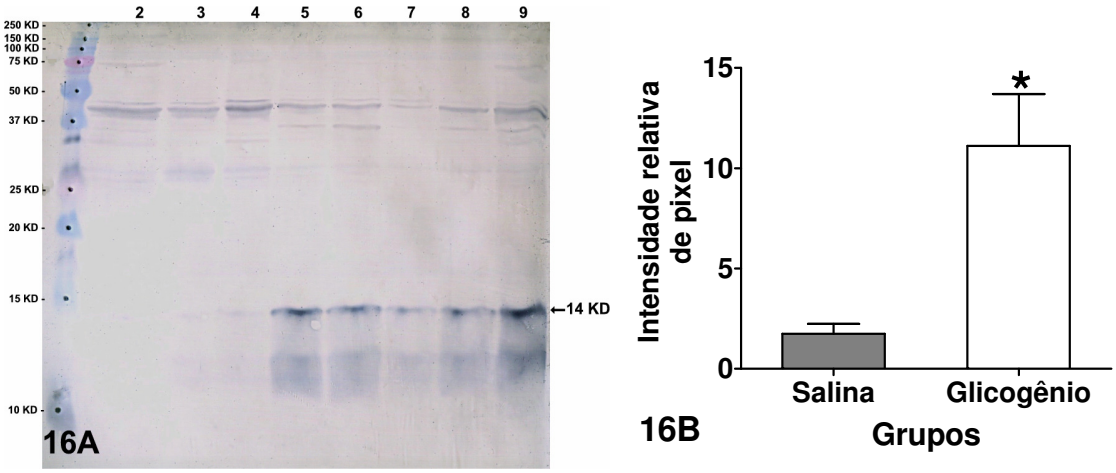

Figura 16 – "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 4 horas após a injeção de salina ou glicogênio. **16A** – Membrana de nitrocelulose demonstrando a marcação com o anticorpo policlonal anti S100A9da banda com massa molecular aproximada a 14 kDa. Poços de 2 a 4 correspondem às amostras de patas tratadas com salina. Poços de 5 a 9 correspondem às amostras de patas tratadas com glicogênio. **16B –** Quantificação relativa da banda de 14 kDa marcada com o anticorpo policlonal anti S100A9em amostras obtidas das patas de ratos após 4 horas da injeção intraplantar de salina ou glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 3 a 5 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

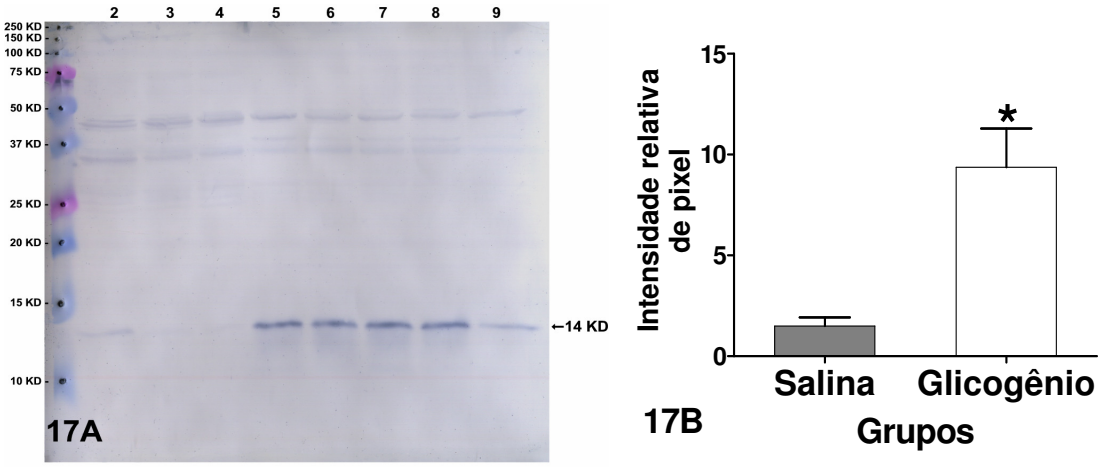

Figura 17 – "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 8 horas após a injeção de salina ou glicogênio**. 17A** – Membrana de nitrocelulose demonstrando a marcação com o anticorpo policlonal anti S100A9da banda com massa molecular aproximada a 14 kDa. Poços de 2 a 4 correspondem às amostras de patas tratadas com salina. Poços de 5 a 9 correspondem às amostras de patas tratadas com glicogênio. **17B –** Quantificação relativa da banda de 14 kDa marcada com o anticorpo policlonal anti S100A9em amostras obtidas das patas de ratos após 8 horas da injeção intraplantar de salina ou glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 3 a 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo tratado com salina. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

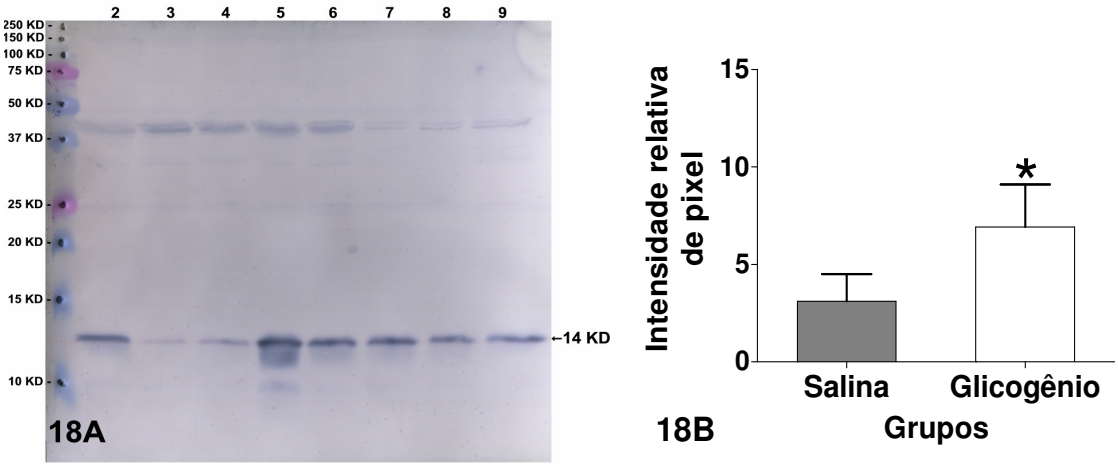

Figura 18 – "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 12 horas após a injeção de salina ou glicogênio. **18A** – Membrana de nitrocelulose demonstrando a marcação com o anticorpo policlonal anti S100A9da banda com massa molecular aproximada a 14 kDa. Poços de 2 a 4 correspondem às amostras de patas tratadas com salina. Poços de 5 a 9 correspondem às amostras de patas tratadas com glicogênio. **18B –** Quantificação relativa da banda de 14 kDa marcada com o anticorpo policlonal anti S100A9em amostras obtidas das patas de ratos após 12 horas da injeção intraplantar de salina ou glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 3 a 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo tratado com salina. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

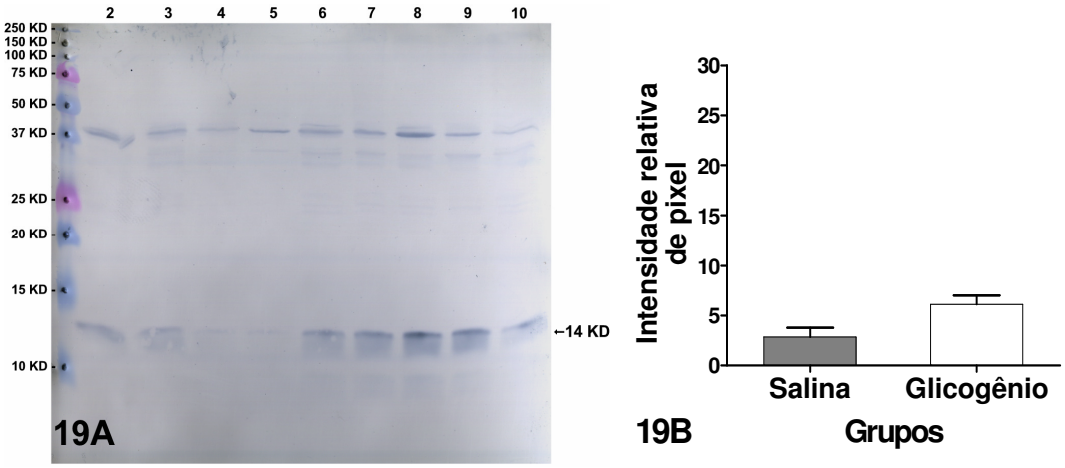

Figura 19 – "Western blotting" e quantificação relativa da proteína S100A9 nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas 24 horas após a injeção de salina ou glicogênio. **19A** – Membrana de nitrocelulose demonstrando a marcação com o anticorpo policlonal anti S100A9da banda com massa molecular aproximada a 14 kDa. Poços de 2 a 5 correspondem às amostras de patas tratadas com salina. Poços de 6 a 10 correspondem às amostras de patas tratadas com glicogênio. **19B –** Quantificação relativa da banda de 14 kDa marcada com o anticorpo policlonal anti S100A9em amostras obtidas das patas de ratos 24 horas da injeção intraplantar de salina ou glicogênio. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 3 a 5 animais por grupo. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

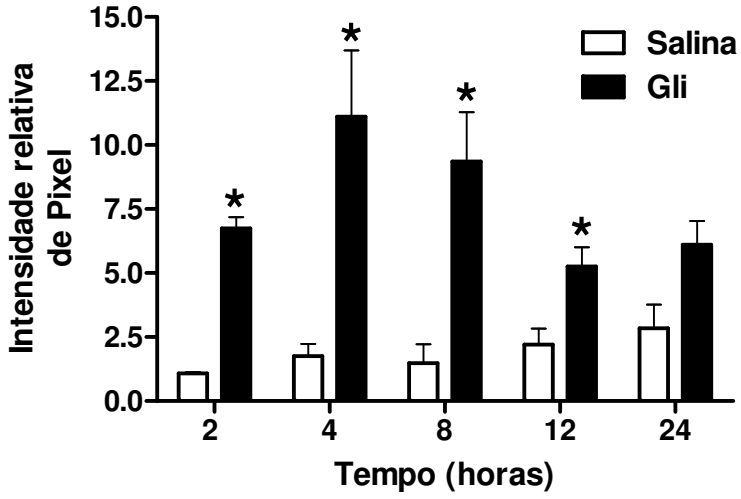

Figura 20 - Quantificação relativa da S100A9 ao longo do tempo nas amostras obtidas da pata de ratos coletadas após a injeção de salina ou glicogênio. A quantificação se refere à banda de 14 kDa marcada com anticorpo policlonal antiS100A9. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 3 a 5 animais por grupo em cada tempo indicado. *$p<0,05$ em relação ao grupo tratado com salina. Quantificação realizada pelo software Total Lab TL100, Nonlinear Dynamics.

4.6 Caracterização do perfil de migração celular induzida pela injeção intraperitoneal de glicogênio em ratos

Para avaliar o perfil de migração celular induzida pelo glicogênio, ratos foram injetados pela via intraperitoneal com 10mL de solução de glicogênio a 1% em salina estéril e o exsudato peritoneal coletado após 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas para a realização da contagem total e diferencial de células migradas. Animais injetados com salina nas mesmas condições foram utilizados como controle.

A injeção de glicogênio induziu um aumento significativo no número total de células migradas entre a segunda e a décima segunda hora após o tratamento, quando comparado com o grupo injetado apenas com salina (controle). Ainda, o pico de migração leucocitária foi observado 8 horas depois da inoculação do irritante. Após 24 horas não foi mais detectada diferença significativa no número total de leucócitos migrados entre o grupo glicogênio e o controle (**Figura 21 e Tabela 1**).

Com relação ao influxo de células polimorfonucleares (PMNs) para o peritôneo dos animais, foi observado um aumento significativo no número dessas células entre 2 e 12 horas após a injeção do glicogênio em comparação com o grupo controle, sendo o pico de migração determinado 8 horas após a injeção do irritante. Quando comparado com o número total de células migradas, a maior concentração de PMNs foi detectada 4 horas após a injeção do glicogênio (91%). A partir de 24 horas da injeção do irritante foi observada uma diminuição significativa na quantidade de PMNs presentes na cavidade abdominal dos animais, não apresentando mais diferença significativa em relação ao grupo injetado com salina (**Figura 22 e Tabela 1**).

Quanto às células mononucleares migradas para o peritôneo dos animais após a injeção do glicogênio, foi observado um decréscimo significativo no número dessas células entre 2 e 8 horas após o tratamento em comparação com o grupo salina, sendo detectada na quarta hora uma queda brusca da migração de mononucleares em ambos os grupos. Entre 12 e 24 horas após o tratamento a migração de mononucleares foi similar entre o grupo glicogênio e salina. Após 48 horas da injeção do glicogênio foi detectado um aumento significativo do número de células mononucleares presentes na cavidade peritoneal dos animais em comparação com o controle (**Figura 23 e Tabela 1**).

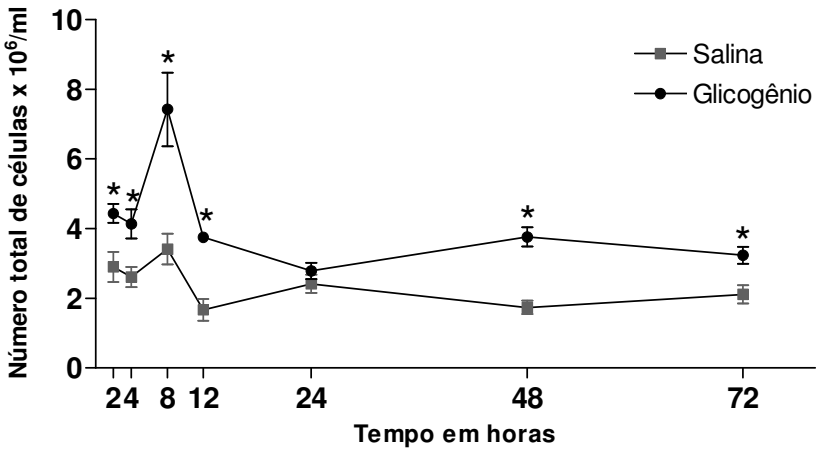

Figura 21 - Quantificação do influxo leucocitário para a cavidade peritoneal de ratos após a injeção de glicogênio. O glicogênio (1% em 10mL) foi administrado pela via intraperitoneal em grupos distintos de animais, os quais foram eutanasiados em diferentes tempos para coleta do exsudato peritoneal e contagem do número total de células migradas. Animais injetados com salina nas mesmas condições foram utilizados como controle. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo salina.

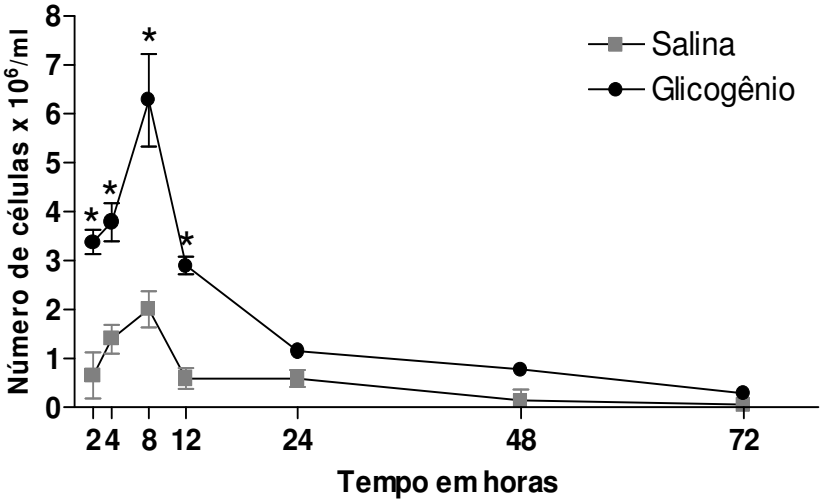

Figura 22 - Cinética do influxo de células polimorfonucleares (PMNs) para a cavidade peritoneal de ratos em resposta a inoculação de glicogênio. O glicogênio (1% em 10mL) foi administrado pela via intraperitoneal em grupos distintos de animais, os quais foram eutanasiados em diferentes tempos para coleta do exsudato peritoneal e contagem do diferencial de células migradas. Animais injetados com salina nas mesmas condições foram utilizados como controle. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo salina.

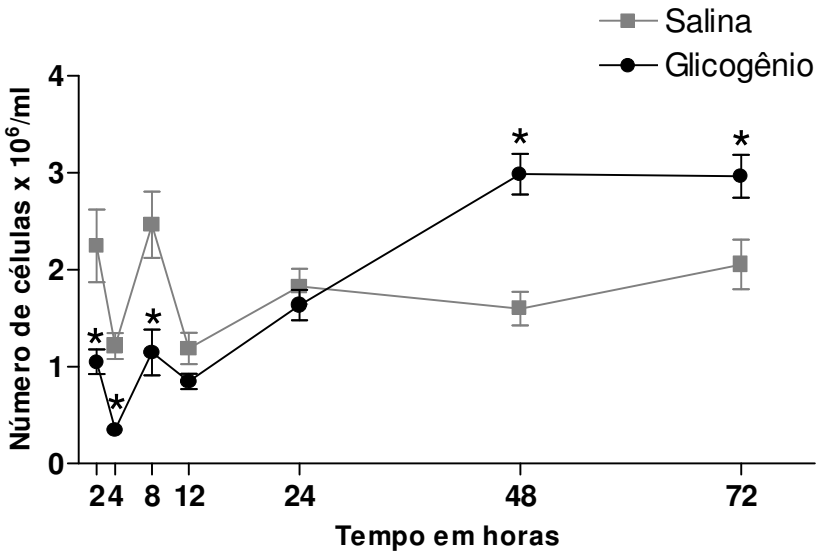

Figura 23 - Cinética de influxo de células mononucleares (MNs) para a cavidade peritoneal de ratos em resposta a inoculação de glicogênio. O glicogênio (1% em 10mL) foi administrado pela via intraperitoneal em grupos distintos de animais, os quais foram eutanasiados em diferentes tempos para coleta do exsudato peritoneal e contagem do diferencial de células migradas. Animais injetados com salina nas mesmas condições foram utilizados como controle. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação ao grupo salina.

Tabela 1 - Cinética de migração leucocitária após a injeção intraperitoneal de glicogênio.

Tempo em horas	Total de células $x10^6$/ml ± e.p.m.	PMNs $x10^6$/ml ± e.p.m.	% de PMNs	MNs $x10^6$/ml ± e.p.m.	% de MNs
2	4,44±0,273*	3,383±0,245*	76	1,052±0,126	24
4	4,14±0,415*	3,787±0,387*	91	0,352±0,040	9
8	7,425±1,056*	6,278±0,947*	85	1,147±0,234	15
12	3,75±0,135*	2,901±0,180*	77	0,848±0,079	23
24	2,787±0,231	1,153±0,119	41	1,634±0,157	59
48	3.762±0.271	0.7735±0.148	08	2.989±0.211*	92
72	3.238±0.245	0.287±0.066	03	2.967±0.222*	97

Glicogênio a 1% (10mL por animal) foi injetado pela via intraperitoneal em diferentes tempos antes da coleta do exsudato peritoneal. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p < 0,05$ em relação aos animais injetados com salina.

PMNs – células polimorfonucleares

MNs – células mononucleares

4.7 Avaliação do efeito da injeção intraplantar de sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal induzido pelo glicogênio sobre a hiperalgesia acarretada pela carragenina

Com o intuito de investigar o possível efeito antinociceptivo de sobrenadantes do exsudato peritoneal obtidos após a administração do glicogênio (1%, 10mL por cavidade) sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina, ratos foram injetados pela via intraplantar com carragenina (200µg /pata) diluída em 100 µL de cada um dos sobrenadantes coletados em diferentes tempos e após 3 horas avaliados no teste de pressão de pata. Sobrenadantes do exsudato peritoneal obtidos após a injeção de salina estéril também foram avaliados sobre a hiperalgesia da carragenina. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes coletados após 2, 4, 8 e 12 horas da inoculação de glicogênio não só reverteram a hiperalgesia da carragenina como também induziram antinocicepção, quando comparados tanto com os grupos controles, animais injetados apenas com Cg ou Cg diluída nos sobrenadantes de salina, quanto com a medida inicial (MI), (**Figuras 24, 25, 26 e 27**). O sobrenadante obtido após 24 horas da injeção i.p. do glicogênio não induziu antinocicepção, mas foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia da carragenina, sendo observada uma diferença significativa tanto em relação ao grupo de animais injetados apenas com Cg ou Cg diluída nos sobrenadantes de salina, quanto à medida inicial (**Figura 28**). Já, os sobrenadantes obtidos após 48 e 72 horas da administração de glicogênio não interferiram com a hiperalgesia induzida pela carragenina (dados não mostrados).

Os sobrenadantes obtidos após 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da injeção intraperitoneal de salina não alteraram a resposta hiperalgésica da carragenina (**Figuras 24, 25, 26, 27 e 28**).

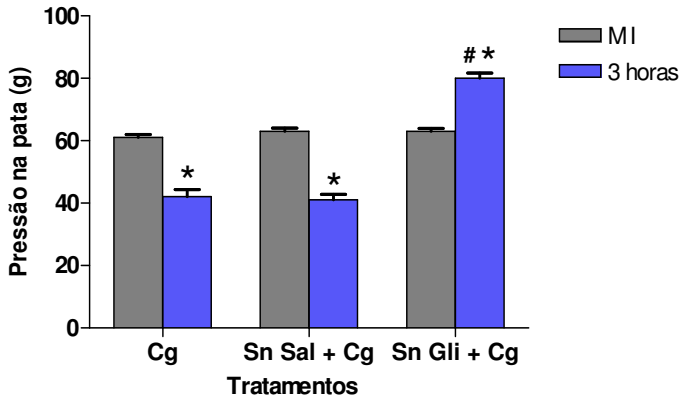

Figura 24 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 2 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Cg (200µg/pata) foi diluída em 100µL do sobrenadante do exsudato peritoneal obtido após 2 horas da injeção de glicogênio a 1%, 10mL por cavidade (Sn Gli). Animais injetados apenas com carragenina ou carragenina diluída no sobrenadante de salina (Sn Sal), obtido nas mesmas condições que o sobrenadante de glicogênio, foram utilizados como controles. O teste de pressão de pata foi aplicado antes (MI) e 3 horas após os tratamentos. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação à medida inicial (MI); # $p<0,05$ em relação ao grupo Cg ou Sn Sal + Cg.

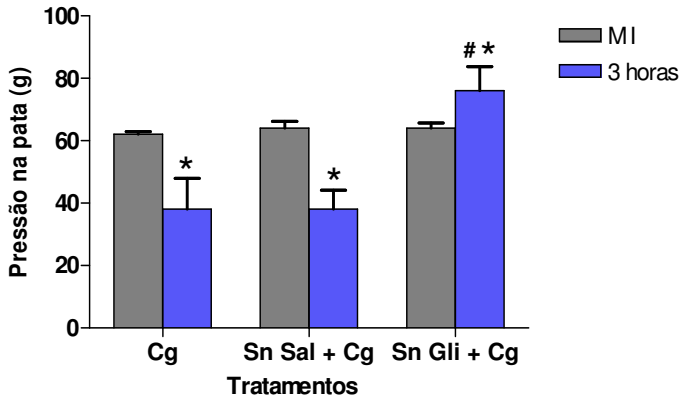

Figura 25 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 4 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Cg (200µg/pata) foi diluída em 100µL do sobrenadante do exsudato peritoneal obtido após 4 horas da injeção de glicogênio a 1%, 10mL por cavidade (Sn Gli). Animais injetados apenas com carragenina ou carragenina diluída no sobrenadante de salina (Sn Sal), obtido nas mesmas condições que o sobrenadante de glicogênio, foram utilizados como controles. O teste de pressão de pata foi aplicado antes (MI) e 3 horas após os tratamentos. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação à medida inicial (MI); # $p<0,05$ em relação ao grupo Cg ou Sn Sal + Cg.

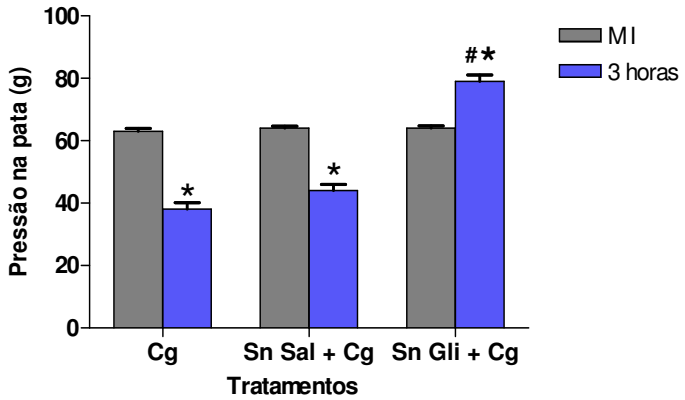

Figura 26 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 8 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Cg (200µg/pata) foi diluída em 100µL do sobrenadante do exsudato peritoneal obtido após 8 horas da injeção de glicogênio a 1%, 10mL por cavidade (Sn Gli). Animais injetados apenas com carragenina ou carragenina diluída no sobrenadante de salina (Sn Sal), obtido nas mesmas condições que o sobrenadante de glicogênio, foram utilizados como controles. O teste de pressão de pata foi aplicado antes (MI) e 3 horas após os tratamentos. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI); # p<0,05 em relação ao grupo Cg ou Sn Sal + Cg.

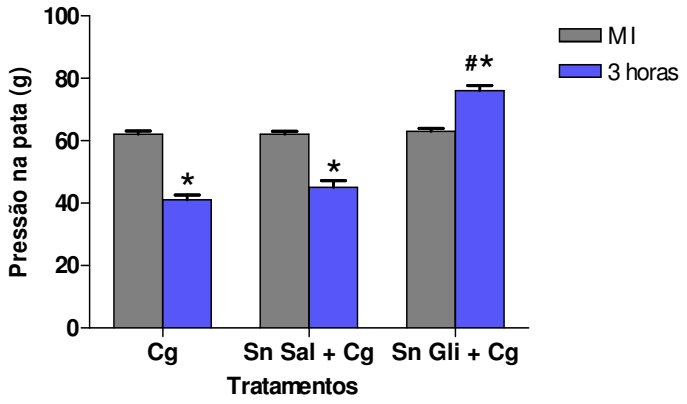

Figura 27 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 12 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Cg (200µg/pata) foi diluída em 100µL do sobrenadante do exsudato peritoneal obtido após 12 horas da injeção de glicogênio a 1%, 10mL por cavidade (Sn Gli). Animais injetados apenas com carragenina ou carragenina diluída no sobrenadante de salina (Sn Sal), obtido nas mesmas condições que o sobrenadante de glicogênio, foram utilizados como controles. O teste de pressão de pata foi aplicado antes (MI) e 3 horas após os tratamentos. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *p<0,05 em relação à medida inicial (MI); # p<0,05 em relação ao grupo aos Cg ou Sn Sal + Cg.

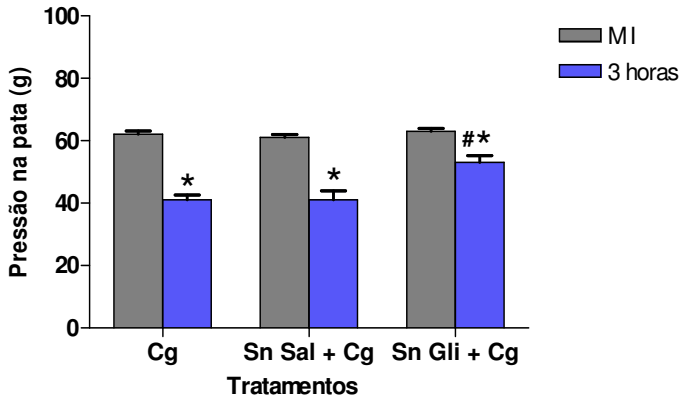

Figura 28 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 24 horas da injeção do glicogênio sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Cg (200µg/pata foi diluída em 100µL do sobrenadante do exsudato peritoneal obtido após 24 horas da injeção de glicogênio a 1%, 10mL por cavidade (Sn Gli). Animais injetados apenas com carragenina ou carragenina diluída no sobrenadante de salina (Sn Sal), obtido nas mesmas condições que o sobrenadante de glicogênio, foram utilizados como controles. O teste de pressão de pata foi aplicado antes (MI) e 3 horas após os tratamentos. Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação à medida inicial (MI); # $p<0,05$ em relação ao grupo Cg ou Sn Sal + Cg.

4.8 Efeito do tratamento do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após a injeção de glicogênio com o anticorpo anti-S100A9 sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina

A fim de investigar se a antinocicepção observada com o sobrenadante obtido de exsudato peritoneal após 4 horas da injeção de glicogênio era devido a uma ação da proteína S100A9, esse sobrenadante foi incubado com o anticorpo anti S100A9por 1 hora. A carragenina (200µg/pata) foi diluída em 100µL do sobrenadante tratado e injetada em animais submetidos ao teste de pressão de pata antes (MI) e após 3 horas do tratamento. O mesmo protocolo foi utilizado para o sobrenadante obtido após 4 horas da injeção intraperitoneal de salina estéril, sendo utilizado como grupo controle. Os dados obtidos demonstraram que o tratamento do sobrenadante do glicogênio com o anti S100A9induziu uma reversão total do efeito antinociceptivo observado. Os animais injetados com esse sobrenadante apresentaram um limiar nociceptivo semelhante ao grupo de ratos injetados apenas com carragenina ou com carragenina diluída no sobrenadante de salina tratado com o anticorpo (**Figura 29**).

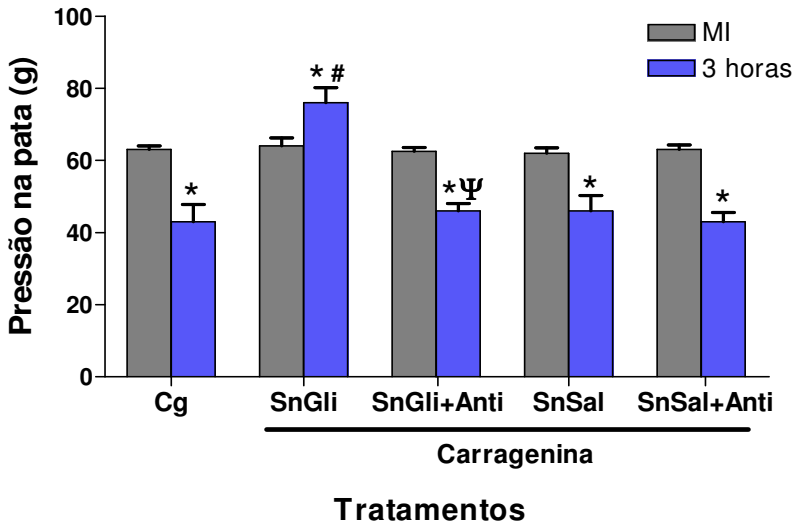

Figura 29 - Efeito do sobrenadante de exsudato peritoneal obtido após 4 horas da injeção do glicogênio incubado com o anti S100A9sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. O sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio foi tratado com o anticorpo policlonal anti S100A9na proporção de 2:1, respectivamente (SnGli+Anti). Em seguida, a Cg (200µg/animal) foi diluída em 100µL dessa solução e injetada via intraplantar, sendo o teste nociceptivo aplicado antes (MI) e 3 horas após os diferentes tratamentos. Foram também avaliados animais injetados apenas com Cg, ou com Cg diluída no sobrenadante de glicogênio (SnGli), ou ainda Cg diluída no sobrenadante de salina incubado ou não com o anticorpo (SnSal+Anti; SnSal, respectivamente). Os dados correspondem a média ± e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. *$p<0,05$ em relação à medida inicial (MI); # $p<0,05$ em relação ao grupo Cg; Ψ $p<0,05$ em relação ao grupo Sn Gli.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Durante o processo inflamatório agudo, nas primeiras horas após a injúria, os neutrófilos são as células majoritárias presentes no foco de lesão e desempenham funções relevantes, tais como fagocitose e liberação de mediadores químicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Ainda, a literatura tem demonstrado que essas células estão envolvidas com a resposta dolorosa, seja por uma ação na indução (CUNHA et al., 2008a,b; TING et al., 2008; VERRI et al., 2009; SACHS et al., 2011) ou por uma atividade inibitória (BRACK et al., 2004a,b; RITTNER et al., 2009a,b; HACKEL et al., 2010) desse fenômeno. Desta forma, não está totalmente esclarecido o papel funcional do neutrófilo na gênese da nocicepção durante a fase aguda da inflamação.

Para melhor se compreender a função do neutrófilo no processo doloroso, nosso grupo tem desenvolvido trabalhos que enfocam a capacidade dessa célula em promover a inibição da nocicepção inflamatória via secreção e ação da proteína ligante de cálcio S100A9 (GIORGI et al., 1998; PAGANO R. L., 2001; PAGANO et al., 2002; 2006). A S100A9 pertence ao grupo de proteínas da família S100 e é encontrada em altas concentrações no citosol de neutrófilos (KLIGMAN; HILT, 1988; EDGEWORTH et al., 1991; SHAFER et al., 1995). Apesar dos resultados obtidos pelo grupo ter demonstrado que durante a peritonite neutrofílica induzida pelo glicogênio foi observada antinocicepção mediada pela S100A9, esses trabalhos foram desenvolvidos apenas em camundongos submetidos ao teste das contorções abdominais. Mais recentemente, dados preliminares demonstraram que a injeção intraplantar de glicogênio induz antinocicepção em ratos submetidos ao teste de pressão de pata 4 horas após a sua inoculação. Ainda, o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal de ratos após 4 horas da injeção desse agente inflamatório, em que foi observado um intenso infiltrado neutrofílico, além de reverter a hiperalgesia induzida pela carragenina também induz antinocicepção no modelo de hiperalgesia mecânica (NOGUEIRA, T. O. & GIORGI, R., comunicação pessoal[1]). Considerando os dados descritos acima, nesse trabalho foi realizado um estudo mais detalhado sobre a participação do neutrófilo no controle da nocicepção durante a inflamação induzida pelo glicogênio em ratos avaliados no modelo de pressão de pata. Em adição, foi investigada a expressão da S100A9 no tecido plantar dos animais injetados com o glicogênio, bem como o possível envolvimento dessa proteína na mediação do efeito antinociceptivo do sobrenadante obtido durante a peritonite neutrofílica detectada 4 horas após a inoculação intraperitoneal do

[1] Informações fornecidas por NOGUEIRA, T. O.; GIORGI, R. em fevereiro de 2008

agente inflamatório.

Inicialmente, foi avaliado o tempo de duração do efeito da injeção intraplantar do glicogênio sobre a resposta dolorosa de ratos submetidos ao teste de pressão de pata. Esse tratamento induziu um efeito antinociceptivo detectado entre 2 e 12 horas após a injeção do agente inflamatório, demonstrando que a cinética do efeito antinociceptivo aqui observada é muito semelhante à duração da antinocicepção detectada no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos injetados via intraperitoneal com o glicogênio (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2006). Em ambos os testes nociceptivos a sensibilidade dolorosa dos animais retornou ao limiar basal após 24 horas do tratamento com o glicogênio, indicando que a antinocicepção observada está restrita a fase inicial da resposta inflamatória, possivelmente nos momentos em que a migração neutrofílica é mais intensa.

Foi demonstrado que a injeção intradérmica de glicogênio a 1% no dorso da pata de ratos não alterou o limiar nociceptivo dos animais submetidos ao teste de pressão de pata (LEVINE et al., 1985). Os dados aqui observados diferem desse resultado, sendo que tal divergência poderia ser devido ao fato das concentrações empregadas nos dois estudos serem distintas, já que no presente trabalho o glicogênio foi utilizado a 5%, concentração 5 vezes maior do que aquela usada por LEVINE et al. (1985).

A injeção de glicogênio induz migração de neutrófilos para o local inflamado, a qual é dependente de moléculas de adesão como a L-selectina, expressa na superfície dos neutrófilos e a E-selectina, expressa no endotélio (MULLIGAN et al., 1998). Ainda, alguns trabalhos sugerem que a L-selectina presente nos neutrófilos, além de se ligarem aos seus receptores específicos, interagem com a E-selectina expressa no endotélio adjacente a essas células, contribuindo para o extravasamento dos neutrófilos para o foco inflamatório (POLLEY et al., 1991; PICKER et al., 1991). Está bem estabelecido na literatura que a fucoidina inibe a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, por se ligarem às moléculas de adesão L e P-selectinas, induzindo uma inibição das mesmas e, consequentemente, impedindo o rolling de leucócitos em diversos modelos inflamatórios (LEY et al., 1993; SHIMAOKA et al.,1996; CUNHA et al., 2008). Com base nesses dados e considerando a hipótese de que os neutrófilos estão envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio no modelo de pressão de pata, a fucoidina foi utilizada previamente à injeção intraplantar de glicogênio nos tempos em que foi detectada a antinocicepção, com o intuito de inibir a migração neutrofílica para o tecido inflamado. Os resultados demonstraram que essa droga reverteu a antinocicepção observada apenas até 8 horas após a injeção do glicogênio.

Curiosamente, o pré-tratamento dos animais com fucoidina também induziu hiperalgesia nos tempo iniciais após a injeção de glicogênio. Esse efeito poderia ser explicado por uma possível ação de mediadores pró-inflamatórios secretados por células distintas dos neutrófilos, como os macrófagos, presentes no tecido inflamado, visto que diversos trabalhos descrevem a participação dessas células no desenvolvimento de hiperalgesia em modelos de inflamação, via secreção de citocinas como IL-6 e TNF-α (CUI et al., 2000; INGLIS et al., 2005). Foi também demonstrado que os macrófagos peritoneais residentes estão envolvidos com a nocicepção detectada no modelo das contorções abdominais induzidas por zimosan e ácido acético, via liberação de TNF- α, IL-1-β e IL-8 (RIBEIRO et al., 2000). Com base nesses dados e considerando que a fucoidina tem um efeito inibitório sobre o rolling, principalmente de neutrófilos, é plausível sugerir que após a administração dessa droga as células predominantes no local da inflamação sejam os macrófagos e esses estejam liberando mediadores responsáveis pela hiperalgesia detectada após a injeção do glicogênio. No entanto, maiores estudos são necessários para se esclarecer a participação dos macrófagos nesse efeito.

Em síntese, esses dados obtidos com a fucoidina indicam que os neutrófilos participam dos mecanismos envolvidos no desencadeamento da antinocicepção observada nas primeiras horas do processo inflamatório induzido pela injeção intraplantar do glicogênio.

Foi demonstrado que a injeção intradérmica de glicogênio na pata de ratos induz um acúmulo local de leucócitos polimorfonucleares entre 3 e 5 horas após o tratamento (WAHBA; BARNES; LAZARUS, 1984). Ainda, LAVICH et al. (2006) demonstraram por análise histológica, em modelo de inflamação induzido por reação alérgica, um aumento significativo no influxo de neutrófilos para a pata inflamada de ratos, o qual foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com fucoidina.

Levando em consideração os resultados descritos acima e com o objetivo de confirmar se a fucoidina foi eficaz em inibir a migração de neutrófilo, os coxins plantares de animais pré-tratados com salina ou fucoidina e injetados com o glicogênio foram coletados em diferentes tempos e analisados histologicamente. Paralelamente, foi realizado o leucograma dos animais antes e após 4 horas dos diferentes tratamentos, a fim de verificar se a quantidade de neutrófilos circulantes estava alterada (dados não mostrados). Os dados aqui obtidos com a análise histológica demonstraram que, no grupo de animais tratados com salina e posteriormente injetados com o glicogênio, o infiltrado leucocitário presente no coxim plantar aumentou gradualmente com o decorrer do tempo, com predominância de células polimorfonucleares, possivelmente neutrófilos, no intervalo entre 2 e 8 horas após a administração do irritante. Cabe ressaltar que no intervalo de tempo em que foi detectado o

aumento da migração de polimorfonucleares para o tecido inflamado também foi observado efeito antinociceptivo induzido pela injeção intraplantar do glicogênio.

O pré-tratamento com fucoidina inibiu a migração de células polimorfonucleares para o coxim plantar dos animais após a injeção do glicogênio, confirmando a eficácia dessa substância em inibir o influxo de neutrófilos para o tecido inflamado. O efeito induzido pela fucoidina foi observado apenas até a oitava hora de tratamento com o irritante, coincidindo com o tempo máximo em que essa substância foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pelo glicogênio. Ainda, foi confirmado que a atividade da fucoidina sobre a migração de polimorfonucleares para o tecido inflamado foi devida a uma inibição do "rolling", uma vez que o leucograma demonstrou um aumento na quantidade dessas células presentes na circulação sanguínea periférica dos animais (dados não mostrados).

Os resultados obtidos com a avaliação da sensibilidade dolorosa de animais após a injeção do glicogênio, na presença ou não do pré-tratamento com a fucoidina, juntamente com aqueles observados na histologia, permitem sugerir uma correlação direta entre a migração de neutrófilos e a resposta antinociceptiva observada, uma vez que os neutrófilos são as células predominantes no tecido inflamado durante o tempo em que foi detectada antinocicepção, sendo que a inibição da migração dessas células para o foco inflamatório reverte o efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio. Esses dados evidenciam que os neutrófilos estão envolvidos com a antinocicepção acarretada pelo glicogênio na fase aguda da inflamação em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata e, confirmam os estudos demonstrados anteriormente pelo nosso grupo sobre o papel dessas células no controle da dor inflamatória (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2006).

Ainda, com base nas observações de que após duas horas da injeção do glicogênio foi detectado efeito antinociceptivo, que os neutrófilos em sua maioria estavam em processo de transmigração e que a fucoidina mostrou-se eficaz em inibir tanto a antinocicepção quanto a migração de polimorfonucleares nesse tempo de tratamento, é plausível especular que essas células possam mediar o efeito antinociceptivo no modelo aqui estudado quando elas ainda estão em processo de transmigração.

Apesar de diversos trabalhos de literatura demonstrarem que os neutrófilos participam da indução da dor durante o processo inflamatório (CUNHA et al., 2008a,b; TING et al., 2008; VERRI et al., 2009; SACHS et al., 2011), os dados aqui apresentados, juntamente com os já demonstrados pelo grupo (GIORGI et al., 1998; PAGANO R. L., 2001; PAGANO et al., 2002; 2006) e os estudos que sugerem a participação dessas células na inibição da nocicepção por uma ação de peptídeos opioides (para revisão MACHELSKA, 2007), suportam a hipótese

de que os neutrófilos desempenham um importante papel no controle endógeno da dor durante a fase inicial da reação inflamatória. Contudo, ainda está para ser esclarecido em que circunstâncias essas células estão envolvidas na indução ou na inibição da resposta dolorosa, tema esse objeto de investigações futuras pelo nosso grupo.

Por serem os neutrófilos as células que mais produzem peptídeos opioides nos estágios iniciais da inflamação, muitos trabalhos têm demonstrado o papel dessas células no controle da hiperalgesia inflamatória, em diferentes modelos de avaliação da nocicepção aguda, via liberação de opioides (CZLONKOWSKI et al., 1993; SCHAFER et al., 1994; BRACK, 2004; BRACK et al., 2004a; BRACK et al., 2004b; RITTNER et al., 2006b; STEIN et al., 1990; HASSAN et al., 1992; PRZEWLOCKI et al., 1992; STEIN, 1995; CABOT, 2001; RITTNER et al., 2001; para revisão MACHELSKA, 2007; RITTNER et al., 2009).

Considerando os dados descritos acima e a hipótese de que os resultados obtidos nesse estudo sejam consequentes de uma ação dos opioides produzidos pelos neutrófilos, foi verificada a participação desses peptídeos no efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio em ratos submetidos ao teste de pressão de pata. Para tanto foi utilizada a naloxona, a qual antagoniza não seletivamente a ativação de receptores opioides, inibindo tanto os receptores mu e delta quanto kappa (JUNI; KLEIN; KEST, 2006). Os resultados obtidos demonstraram que tanto o tratamento local quanto sistêmico com naloxona não interferiu com o efeito antinociceptivo observado, descartando a hipótese de que os opioides medeiam a antinocicepção induzida pela injeção intraplantar do glicogênio no modelo aqui utilizado.

Uma vez que estudos anteriores demonstraram que a proteína S100A9 é responsável pelo efeito antinociceptivo observado durante a peritonite neutrofílica induzida pelo glicogênio em camundongos avaliados no modelo das contorções abdominais (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2006), o passo seguinte desse estudo foi avaliar a expressão dessa proteína nas amostras obtidas das patas de animais injetados apenas com salina ou glicogênio. Esse experimento foi realizado a fim de verificar se a S100A9 é secretada nas condições experimentais aqui empregadas.

Tem sido descrito que a quantificação da proteína S100A9 ou do complexo calprotectina é empregada para a detecção de processos inflamatórios não infecciosos, sendo utilizadas como biomarcadores de diversas doenças inflamatórias (KERKHOFF; KLEMPT; SORG, 1998; FOELL; ROTH, 2004a; LUGERING et al., 1995; GOLDEN et al., 1996; DRYNDA et al., 2004). Apesar da S100A9 ou da calprotectina estarem relacionadas à indicação clínica da presença de um processo inflamatório, muitos trabalhos relatam funções pró ou anti-inflamatórias para as mesmas (VOGL et al., 2007; SIMARD et al., 2010; LOSER et al., 2010;

DESSING et al., 2010; CHENG et al., 2008; SU et al., 2010; SINHA et al., 2010; SHIBATA et al., 2004). O efeito biológico da S100A9 secretada durante a inflamação foi demonstrado pelo nosso grupo, em que o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após a injeção do glicogênio induziu antinocicepção em camundongos submetidos ao teste das contorções abdominais, o qual foi abolido quando a proteína S100A9 foi adsorvida desse sobrenadante (PAGANO et al., 2006).

De acordo com essas observações, para verificar a expressão da S100A9 nas amostras obtidas da pata dos animais nos tempos em que foi detectado tanto aumento da migração de neutrófilos quanto efeito antinociceptivo após a injeção do glicogênio, foi utilizado um anticorpo policlonal anti S100A9 e as amostras analisadas por "Western blotting". Foi evidenciada a marcação de uma banda com peso molecular de 14 kDa em todas as amostras avaliadas, porém a maior expressão proteica foi detectada nas amostras obtidas de animais tratados com glicogênio. Uma vez que a massa molecular da proteína S100A9 é de 14 kDa (HOGG; ALLEN; EDGEWORTH, 1989) e que o anticorpo aqui empregado foi capaz de marcar uma banda com peso molecular próxima de 14 kDa, esses dados demonstram que a S100A9 está presente nas amostras avaliadas. A maior expressão dessa proteína foi detectada no intervalo de tempo em que foi observado efeito antinociceptivo induzido pelo glicogênio, bem como quando a migração de neutrófilos para a pata dos animais foi mais intensa.

Uma vez que a S100A9 está presente em altas concentrações no citosol de neutrófilos, os dados obtidos indicam que a proteína presente nas amostras analisadas deve ser proveniente dos neutrófilos migrados após a injeção do glicogênio. É importante ressaltar que a maior expressão da proteína S100A9 na pata dos animais ocorreu entre 4 e 8 horas após a injeção do glicogênio, corroborando os resultados descritos anteriormente pelo grupo, que demonstram que no mesmo intervalo de tempo foi observada a secreção dessa proteína durante a peritonite neutrofílica induzida pelo glicogênio em camundongos (PAGANO et al., 2006). Ainda, foi possível notar uma relação entre a expressão da S100A9 e a duração da antinocicepção induzida pelo glicogênio, visto que no tempo em que não se detecta mais o efeito antinociceptivo, 24 horas após administração do agente, não há mais diferença significativa na expressão da proteína entre as amostras do grupo controle e experimental. Dessa forma, os resultados aqui apresentados referentes à expressão e quantificação da S100A9, em conjunto com os estudos já realizados (GIORGI et al., 1998; PAGANO R. L., 2001; PAGANO et al., 2002; 2006), reforçam a hipótese de que durante a migração neutrofílica induzida por alguns agentes inflamatórios a proteína S100A9 pode ser a substância responsável pelo efeito antinociceptivo observado em diferentes modelos de nocicepção.

Resumidamente, os resultados aqui apresentados referentes à injeção intraplantar do glicogênio demonstram que esse agente irritante induz antinocicepção nos tempos iniciais do processo inflamatório, no modelo de pressão de pata, e sugerem que os neutrófilos participam desse efeito, uma vez que o tratamento com fucoidina reverteu a antinocicepção induzida pelo glicogênio. A análise histológica do coxim plantar dos animais demonstrou que os neutrófilos são predominantes durante o efeito antinociceptivo e confirmou que a fucoidina acarreta uma redução da migração dessas células no início da reação inflamatória. A administração sistêmica ou local do antagonista de receptores opioides não inibiu a antinocicepção observada, indicando que os peptídeos opioides não participam desse efeito. Ainda, a maior expressão da proteína S100A9 na pata dos animais injetados com o glicogênio coincidiu com os tempos em que foi observado tanto o maior influxo de neutrófilos para o tecido inflamado quanto o efeito antinociceptivo induzida pelo agente irritante, sugerindo que no modelo aqui empregado os neutrófilos estão envolvidos na antinocicepção via a secreção da proteína S100A9.

Considerando os dados obtidos por LEVINE et al. (1985) em que o sobrenadante obtido do exsudato inflamatório de ratos injetados com glicogênio não induziu hiperalgesia mecânica, bem como os resultados que demonstraram efeito antinociceptivo nos sobrenadantes provenientes do exsudato inflamatório após 4 ou 8 horas da injeção do glicogênio em camundongos (PAGANO et al., 2006), nesse trabalho também foi investigada a capacidade dos sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal de ratos injetados com o glicogênio em inibir a hiperalgesia induzida pela carragenina. Uma vez que dados preliminares demonstraram que o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção do glicogênio não induziu alteração do limiar nociceptivo de ratos submetidos ao teste de pressão de pata, similar ao que foi observado por LEVINE et al. (1985), o estudo com os sobrenadantes foi realizado apenas sobre a hiperalgesia acarretada pela carragenina.

Inicialmente, foi avaliado o perfil de migração celular para a cavidade peritoneal de ratos injetados com o glicogênio a fim de caracterizar a peritonite neutrofílica nas condições empregadas no trabalho aqui desenvolvido. A injeção intraperitoneal de glicogênio induziu aumento significativo no número total de leucócitos migrados para a cavidade peritoneal dos animais entre 2 e 12 horas após o tratamento, o qual foi decorrente do maior influxo de células polimorfonucleares para o peritôneo dos animais nesse intervalo de tempo, caracterizando a peritonite neutrofílica na fase inicial do processo inflamatório. Esses dados são semelhantes aos obtidos anteriormente (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2006), em que foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de glicogênio em camundongos induziu um aumento

significativo de células polimorfonucleares na cavidade abdominal dos animais após 2 horas da injeção do irritante, com pico observado na oitava hora de tratamento.

Dando continuidade, os sobrenadantes dos exsudatos peritoneais obtidos após a injeção do glicogênio ou salina foram avaliados sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Foi observado que os sobrenadantes de glicogênio obtidos entre 2 e 12 horas após o tratamento reverteram a hiperalgesia acarretada pela carragenina e ainda induziram antinocicepção, demonstrando uma atividade antinociceptiva desses sobrenadantes. Essa atividade foi observada com os sobrenadantes obtidos nos tempos em que foi detectado um aumento significativo na quantidade de células polimorfonucleares presentes no exsudato peritoneal dos animais injetados com o glicogênio. Esses dados sugerem que os neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal de ratos após a injeção do glicogênio possam secretar alguma(s) substância(s) com efeito inibitório sobre a hiperalgesia no modelo aqui empregado, além de induzir antinocicepção. O efeito parcial demonstrado com o sobrenadante de 24 horas após a injeção do glicogênio, indica que a partir desse tempo o(s) fator(es) responsável(eis) pelos efeitos descritos começa perder sua atividade, a qual não é mais detectada no sobrenadante de 48 horas. Os resultados aqui obtidos são semelhantes aos demonstrados por PAGANO et. al. (2006) em que os sobrenadantes obtidos após 4 e 8 horas da injeção intraperitoneal de glicogênio em camundongos induziram antinocicepção no teste de contorções abdominais, a qual não foi mais observado com os sobrenadantes obtidos após 24 horas da injeção do agente inflamatório.

Como descrito anteriormente, os sobrenadantes do exsudato peritoneal coletados 4 e 8 horas após a injeção de glicogênio acarretaram efeito antinociceptivo quando inoculados via intraperitoneal em animais submetidos ao teste das contorções abdominais (PAGANO et al., 2006). Ainda, foi demonstrado que esse efeito é promovido pela presença da proteína S100A9 nesses sobrenadantes, uma vez que a adsorção da proteína pelo tratamento com um anticorpo anti S100A9 reverteu completamente o efeito antinociceptivo observado (PAGANO et al., 2006). Com base nesses dados e com o objetivo de avaliar a participação da proteína S100A9 no efeito antinociceptivo aqui observado sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina, o sobrenadante obtido do exsudato peritoneal após 4 horas da injeção de glicogênio foi tratado com um anticorpo policlonal anti S100A9. Esse tratamento induziu uma inibição completa do efeito antinociceptivo observado sobre a hiperalgesia da carragenina, confirmando a participação da proteína S100A9 nesse efeito. É importante ressaltar que até o momento só foi possível demonstrar esse efeito com o sobrenadante de 4 horas, porém a participação da S100A9 na antinocicepção induzida pelos demais sobrenadantes será investigada.

Como demonstrado com a injeção intraplantar do glicogênio, os dados aqui apresentados sobre a atividade antinociceptiva observada na hiperalgesia da carragenina com os sobrenadantes obtidos dos exsudatos peritoneais de animais injetados com glicogênio, também indicam que os neutrófilos possam estar envolvidos nesse efeito, visto que a maior concentração dessas células na cavidade peritoneal dos animais ocorre nos tempos em que foi detectada a antinocicepção. Ainda, que a substância responsável por esse efeito, pelo menos com o sobrenadante de 4 horas, é a proteína S100A9. Esses dados são similares aos anteriores demonstrados pelo nosso grupo (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2006) e novamente confirmam a importância do neutrófilo na controle da dor inflamatória por uma ação da proteína S100A9 secretada por essas células.

Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho sugerem a participação do neutrófilo e da proteína S100A9 na antinocicepção induzida pelo glicogênio em duas situações distintas, uma caracterizada pela injeção intraplantar de glicogênio em ratos avaliados no teste de pressão de pata e outra, pela administração intraperitoneal desse agente inflamatório, em que os sobrenadantes peritoneais obtidos após esse tratamento foram testados sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Em ambos as situações fica evidente mais uma vez o papel do neutrófilo no controle endógeno da dor via a secreção da proteína S100A9, sugerindo que essa proteína possa ser um mediador inibitório da nocicepção durante a fase aguda do processo inflamatório.

Resumo dos resultados

6 RESUMO DOS RESULTADOS

- ✓ A injeção intraplantar de glicogênio induz antinocicepção nos tempos iniciais do processo inflamatório e os neutrófilos estão possivelmente envolvidos com esse efeito, uma vez que o tratamento com fucoidina reverte tanto o efeito antinociceptivo observado quanto a migração dos neutrófilos para o coxim plantar dos animais;

- ✓ A administração sistêmica ou local de naloxona, não inibe a antinocicepção induzida pelo glicogênio, indicando que os peptídeos opioides não participam desse efeito;

- ✓ Considerando que o aumento da expressão da S100A9 é observado no mesmo intervalo de tempo em que ocorre tanto uma intensa migração neutrófilica para o coxim plantar dos animais quanto o efeito antinociceptivo após a injeção intraplantar do glicogênio, é plausível sugerir a participação dessa proteína na antinocicepção observada após a sua secreção pelos neutrófilos;

- ✓ Sobrenadantes obtidos do exsudato peritoneal de animais injetados com glicogênio, nos tempos iniciais do processo inflamatório, induzem antinocicepção e o efeito observados pelo menos no tempo de 4 horas é decorrente da ação da proteína S100A9.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados neste estudo permitem concluir que a antinocicepção acarretada pelo glicogênio em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata é dependente da migração neutrofílica, não está relacionada à liberação de peptídeos opioides, mas possivelmente à secreção da proteína S100A9 por essas células. Ainda, os dados obtidos com os sobrenadantes do exsudato peritoneal após a injeção do glicogênio, demonstram que durante a peritonite neutrofílica a proteína S100A9 é responsável pelo efeito antinociceptivo observado sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. Em conjunto, esse trabalho reforça a hipótese de que os neutrófilos possuem uma atividade inibitória sobre a gênese da dor e que esse efeito está relacionado com a proteína S100A9 secretada por essas células, sugerindo a S100A9 como um novo mediador endógeno envolvido no controle da nocicepção durante a fase aguda do processo inflamatório.

Referências

8 REFERÊNCIAS

AGUIAR-PASSETI, T.; POSTOL, E.; SORG, C.; MARIANO, M. Epithelioid cells from foreign-body granuloma selectively express the calcium-binding protein MRP-14, a novel down-regulatory molecule of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 6, p. 852-858, 1997.

ANDERSSON, K. B.; SLETTEN, K.; BERNTZEN, H. B.; FAGERHOL, M. K.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; JELLUM, E. Leukocyte L1 protein and the cystic fibrosis antigen. **Nature**, v. 332, n. 6166, p. 688, 1988.

BAULDRY, S. A.; WOOTEN, R. E. Leukotriene B4 and platelet activating factor production in permeabilized human neutrophils: role of cytosolic PLA2 in LTB4 and PAF generation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1303, n. 1, p. 63-73, 1996.

BENNETT, G.; AL-RASHED, S.; HOULT, J. R.; BRAIN, S. D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, v. 77, n. 3, p. 315-322, 1998.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GIRÃO, V. C. C.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 347, n. 4, p. 265-273, 2007.

BRACK, A. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. **Pain**, v. 108, n. 1-2, p. 67-75, 2004.

BRACK, A.; RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; BESCHMANN, K.; SITTE, N.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 100, n. 1, p. 149-157, 2004a.

BRACK, A.; RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; LEDER, K.; MOUSA, S. A.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Control of inflammatory pain by chemokine-médiated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 229-238, 2004b.

BRANDTZAEG, P.; DALE, I.; GABRIELSEN, T. O. The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. **Histopathology**, v. 21, n. 2, p. 191–196, 1992.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, n. 4, p. 457-465, 2006.

CABOT, P. J. Immune-derived opioids and peripheral antinociception. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 28, n. 3, p. 230-232; 2001.

CHENG, P.; CORZO, C. A.; LUETTEKE, N.; YU, B.; NAGARAJ, S.; BUI, M. M.; ORTIZ, M.; NACKEN, W.; SORG, C.; VOGL, T.; ROTH, J.; GABRILOVICH, D. I. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 10, p. 2235-2249, 2008.

CROCE, K.; GAO, H.; WANG, Y.; MOOROKA, T.; SAKUMA, M.; SHI, C.; SUKHOVA, G. K.; PACKARD, R. R.S.; HOGG, N.; LIBBY, P.; SIMON, D. I. Myeloid-Related Protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. **Circulation**, v. 120, n. 5, p. 427-436, 2009.

CUI, J. G.; HOLMIN, S.; MATHIESEN, T.; MEYERSON, B. A.; LINDEROTH, B. Possible role of inflammatory médiators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain,** v. 88, n. 3, p. 239-248, 2000.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a médiator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-médiated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 6, p. 1418-1424, 2000.

CUNHA, T. M.; BARSANTE, M. M.; GUERRERO, A. T.; VERRI JR, W. A.; FERREIRA, S. H.; COELHO, F. M.; BERTINI, R.; GIACINTO, C. DI.; ALLEGRETTI, M.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 460-470, 2008a

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824- 832, 2008b

CZLONKOWSKI, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. **European Journal of Pharmacology**, v. 242, n. 3, p. 229-235, 1993.

DALE, C. S. **Avaliação do efeito antinociceptivo de peptídeo sintético homólogo à porção C-terminal da proteína ligante de cálcio MRP-14 murina em modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por proteases**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DALE, C. S.; Altier, C.; CENAC, N.; GIORGI, R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; ZAMPONI, G. W.; VERGNOLLE, N. Analgesic properties of S100A9 C-terminal domain: a mechanism dependent on calcium channel inhibition. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 427-438, 2009.

DALE, C. S.; CENAC, N.; BRITTO, L. R. G.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VERGNOLLE, N.; GIORGI, R. The C-terminus murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by yhe agonist peptide of protease-activated Receptor 2 (PAR_2). **British Journal of Farmacology**, v. 149, n. 4, p. 374-384; 2006b.

DALE, C. S.; GONCALVES, L. R.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA SILVA, A. M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 81-89, 2004.

DALE, C. S.; PAGANO, R. L.; PACCOLA, C. C.; PINOTTI-GUIRAO, T.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GIORGI, R. Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2794-2802, 2006a.

DE LORENZO, B. H.; GODOY, L. C.; NOVAES E BRITO, R. R.; PAGANO, R. L.; AMORIM-DIAS, M. A.; GROSSO, D. M.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is médiated by the S100A9 calcium-binding protein. **Immunobiology**, v. 215, n. 5, p. 341-347, 2010.

DESSING, M. C.; BUTTER, L. M.; TESKE, G. J.; CLAESSEN, N.; VAN DER LOOS, C. M.; VOGL, T.; ROTH, J.; VAN DER POLL, T.; FLORQUIN,S.; LEEMANS, J. C. S100A8/A9 Is Not Involved in Host Defense against Murine Urinary Tract Infection. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13394, 2010.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1627-1652, 1991.

DRYNDA, S.; RINGEL, B.; KEKOW, M.; KUHNE, C.; DRYNDA, A.; GLOCKER, M.O.; THIESEN, H. J.; KEKOW, J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. **Pathology, Research and Practice**, v. 200, n. 2, p. 165-171, 2004.

DUBRAVEC, D. B.; SPRIGGS, D. R.; MANNICK, J. A.; RODRICK, M. L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 17, p. 6758-6761, 1990.

EDGEWORTH, J.; GORMAN, M.; BENNETT, R.; FREEMONT, P.; HOGG, N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 12, p. 7706-7713, 1991.

FERREIRA, S. H. Analgesia Con Óxido Nítrico y Analgesicos. In: BEZARRUETA, J. R. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores**. Santander : Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, 1994. p.149-162.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-médiated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227-1231, 1993.

FOELL, D.; FROSCH, M.; SORG, C.; ROTH, J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 344, n. 1-2, p. 37-51, 2004b.

FOELL, D., ROTH, J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3762–3771, 2004a.

FREEMONT, P.; HOGG, N.; EDGEWORTH, J. Sequence identity. **Nature**, v. 339, n. 6225, p. 516, 1989.

GALLIN, J. I.; SNYDERMANN, R. **Inflammation-Basic Principles and Clinical Correlates**. 3. ed. New York: Lippincott, Willians & Wilkins, 1999.

GIORGI, R.; PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; AGUIAR-PASSETI, T.; SORG, C.; MARIANO, M. Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 2, p. 214-220, 1998.

GOLDEN, B. E.; CLOHESSY, P. A.; RUSSELL, G.; FAGERHOL, M. K. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 74, n. 2, p. 136–139, 1996.

HACKEL, D., STOLZ, A., MOUSA, S. A., BRACK, A., RITTNER, H. L. Recruitment of opioid peptide-containing neutrophils is independent of formyl peptide receptors. **Journal of Neuroimmunology**, 2010. Doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.027. Disponível em http://www.elsevier.com/locate/jneuroim. Acesso em: 06 nov. 2010

HARLOW, E.; LANE, D. Immunoblotting. In:_____. **Antibodies: a Laboratory Manual**. 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. p. 471-510.

HASSAN, A. H.; PZEWLOCKI, R.; HERZ, A.; STEIN, C. Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. **Neuroscience letters**, v. 140, n. 1, p. 85-88, 1992.

HESSIAN, P. A.; EDGEWORTH, J.; HOGG, N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 53, n. 2, p. 197-204, 1993.

HOGG, N.; ALLEN, C.; EDGEWORTH, J. Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. **European Journal of Immunology**, v. 19, n. 6, p. 1053-1061, 1989.

IKEMOTO, M.; MURAYAMA, H.; ITOH, H.; TOTANI, M.; FUJITA, M. Intrinsic function of S100A8/A9 complex as an anti-inflammatory protein in liver injury induced by lipopolysaccharide in rats. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 376, n. 1-2, p. 197-204, 2007.

INGLIS, J. J.; NISSIM, A.; LEES, D. M.; HUNT, S. P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B. L. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy,** v. 7, n. 4, p. 807-816, 2005.

INSEL, P. A. Fármacos Analgésicos - Antipiréticos e Antiinflamatórios e Medicamentos Usados no Tratamento de Gota. In: GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Brasil, 1996. p. 449-480.

JUNI, A.; KLEIN, G.; KEST, B. Morphine hyperalgesia in mice is unrelated to opioid activity, analgesia, or tolerance: evidence for multiple diverse hyperalgesic systems. **Brain Research**. v. 1070, n. 1, p. 35-44, 2006.

KELLY, S. E.; JONES, D. B.; FLEMING, S. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. **The Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 17-21, 1989.

KERKHOFF, C.; KLEMPT, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1448, n. 2, p. 200-211, 1998.

KLIGMAN, D.; HILT, D. C. The S100 protein family. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, n. 11, p. 437-443, 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In:_____. **Patologia**. 7. ed. São Paulo: Saunders Elsevier, 2005. p.49-89.

LAEMMLI, U. K. Cleavege of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. N**ature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGASSE, E.; CLERC, R. G. Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 6, p. 2402-2410, 1988.

LAVICH, T. R.; SIQUEIRA, R. A.; FARIAS-FILHO, F. A.; CORDEIRO, R. S.; RODRIGUES e SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. **Pain**, v. 125, n. 1-2, p. 180-187, 2006.

LEVINE, J. D.; GOODING, J. DONATONI, P.; BORDEN, L.; GOETZL, E. J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 3025-3029, 1985.

LEVINE, J. D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E. J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, n. 4663, p. 743-745, 1984.

LEY, K.; LINNEMANN, G.; MEINEN, M.; STOOLMAN, L.M.; GAEHTGENS, P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. **Blood**, v. 81, n. 1, p. 177-185, 1993

LIAO, H.; WU, J.; KUHN, E.; CHIN, W.; CHANG, B.; JONES, M.D.; O'NEIL, S.; CLAUSER, K.R.; KARL, J.; HASLER, F.; ROUBENOFF, R.; ZOLG, W.; GUILD, B.C. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3792-3803, 2004.

LIM, S. Y.; RAFTERY, M.; CAI, H.; HSU, K.; YAN, W. X.; HSEIH, H. L.; WATTS, R. N.; RICHARDSON, D.; THOMAS, S.; PERRY, M.; GECZY, C. L. S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 8, p. 5627-5636, 2008.

LIM, S. Y.; RAFTERY, M. J.; GOYETTE, J.; GECZY, C. L. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14377-14388, 2010.

LINDEMANN, A.; RIEDEL, D.; OSTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 4, p. 1308-1312, 1989.

LUGERING, N.; STOLL, R.; KUCHARZIK, T.; SCHMID, K. W.; ROHLMANN, G.; BURMEISTER, G.; SORG, C.; DOMSCHKE, W. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2_)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. **Digestion**, v. 56, n. 5, p. 406–414, 1995.

LORD, P. C.; WILMOTH, L. M.; MIZEL, S. B.; MCCALL, C. E. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 4, p. 1312-1321, 1991.

LOSER, K.; VOGL, T.; VOSKORT, M.; LUEKEN, A.; KUPAS, V.; NACKEN, W.; KLENNER, L.; KUHN, A.; FOELL, D.; SOROKIN, L.; LUGER, T. A.; ROTH, J.; BEISSERT, S. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. **Nature Medicine**. v. 16, n. 6, p. 713-717, 2010.

MACHELSKA, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 355-363, 2007.

MOILANEN, E.; KIRKKOLA, A. L.; KANKAANRANTA, H.; NIEMINEN, M. M.; VAPAATALO, H. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B4 in isolated human polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 705-714, 1993.

MULLIGAN, M. S.; LENTSCH, A. B.; MIYASAKA, M.; WARD, P. A. Cytokine and adhesion molecule requirements for neutrophil recruitment during glycogen-induced peritonitis. **Inflammation research**. v. 47, n. 6, p. 251-255, 1998.

NEWTON, R. A.; HOGG, N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 3, p. 1427-1435, 1998.

ODINK, K.; CERLETTI, N.; BRUGGEN, J.; CLERC, R. G.; TARCSAY, L.; ZWADLO, G.; GERHARDS, G.; SCHLEGEL, R.; SORG, C. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 330, n. 6143, p. 80-82, 1987.

PACCOLA, C. C.; GUTIERREZ, V. P.; LONGO, I.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIORGI, R. Antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neurophatic pain. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1806-1814, 2008.

PAGANO, R. L. **Participação da proteína ligante de cálcio MRP-14 no controle da dor inflamatória em peritonite neutrofílica induzida por carragenina ou zimosan em camundongos**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 médiate carrageenan-induced antinociception in mice. **Médiators of Inflammation**, v. 11, n. 4, p. 203-210, 2002.

PAGANO, R. L.; MARIANO, M.; GIORGI, R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception médiate by the protein S100A9. **Médiators of Inflammation**, v. 2006, n. 4, p. 36765, 2006.

PAGANO, R. L.; SAMPAIO, S. C.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells. **Inflammation Research**, v. 54, n. 5, p. 204-210, 2005.

PAGANO, R. L.; SAMPAIO, S. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GIORGI, R. Involvement of proteinase-activated receptors 1 and 2 in spreading and phagocytosis by murine adherent peritoneal cells: modulation by the C-terminal of S100A9 protein. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 240-246, 2010.

PICKER, L. J.; WARNOCK, R. A.; BURNS, A.R.; DOERSCHUK, C. M.; BERGEL, E. L.; BUTCHER, E. C. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. **Cell**. v. 66, n. 5, p. 921-933, 1991. Errata em: **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1267, 1991.

POLLEY, M. J.; PHILLIPS, M. L.; WAYNER, E.; NUDELMAN, E.; SINGHAL, A.K.; HAKOMORI, S.; PAULSON, J. C. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 14, p. 6224-6228. 1991.

PRZEWLOCKI, R.; HASSAN, A. H.; LASON, W.; EPPLEN, C.; HERZ, A.; STEIN, C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. **Neuroscience**, v. 48, n. 2, p. 491-500, 1992.

PUKAC, L. A.; CARTER, J. E.; MORRISON, K. S.; KARNOVSKY, M. J. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. **BioTechniques**, v. 23, n. 3, p. 385-388.

RAFTERY, M. J.; HARRISON, C. A.; ALEWOOD, P.; JONES, A.; GECZY, C. L. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. **The Biochemical Journal**, v. 316, n. Pt 1, p. 285–293, 1996.

RAMMES, A.; ROTH, J.; GOEBELER, M.; KLEMPT, M.; HARTMANN, M.; SORG, C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9496-9502, 1997.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 111, n. 4, p. 409-419; 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos Analgésicos. In:_____. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 588-609.
RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 387, n. 1, p. 111-118; 2000.

RITTNER, H. L.; BRACK, A.; MACHELSKA, H.; MOUSA, S. A.; BAUER, M.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 95, n. 2, p. 500-508, 2001.

RITTNER, H. L.; HACKEL, D.; VOIGT, P.; MOUSA, S.; STOLZ, A.; LABUZ, D.; SCHÄFER, M.; SCHAEFER, M.; STEIN, C.; BRACK, A. Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000362, 2009a.

RITTNER, H. L.; HACKEL, D.; YAMDEU, R. S.; MOUSA, S. A.; STEIN, C.; SCHÄFER, M.; BRACK, A. Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue--role of hypertonicity and the perineurium. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 4, p. 548-557, 2009b.

RITTNER, H. L.; LABUZ, D.; RICHTER, J. F.; BRACK, A.; SCHÄFER, M.; STEIN, C.; MOUSA, S. A. CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 8, p. 1021-1032, 2007.

RITTNER, H. L.; LABUZ, D.; SCHAEFER, M.; MOUSA, S. A.; ACHULS, S.; SCHSFER, M.; STEIN, C.; BRACK, A. Pain control by CXCR2 ligands through Ca2+-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2627-2629; 2006b.

RITTNER, H. L.; MOUSA, S. A.; LABUZ, D.; BESCHMANN, K.; ACHAFFER, M.; STEIN, C.; BRACK, A. Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 5, p. 1022-1032; 2006a.

SACHS, D.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; LOPES, F.; PINHO, V; AMARAL, F. A.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, A. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Cooperative role of TNF-α, IL-1β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 72-83, 2011.

SANTHANAGOPALAN, V.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Resistance of zinc-supplemented Candida albicans cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 5, p. 1289-1294, 1995.

SCHAFER, M.; CARTER, L.; STEIN, C. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4219-4223, 1994.

SCHAFER, B. W.; WICKI, R.; ENGELKAMP, D.; MATTEI, M. G.; HEIZMANN, C. W. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. **Genomics**, v. 25, n. 3, p. 638-643, 1995.

SHIBATA, F.; MIYAMA, K.; SHINODA, F.; MIZUMOTO, J.; TAKANO, K.; NAKAGAWA, H. Fibroblast growth-stimulating activity of S100A9 (MRP-14). **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 11, p. 2137-2143, 2004.

SHIMADA, S.; NAKAMURA, M.; TANAKA, Y.; TSUTSUMI, K.; KATANO, M.; MASUKO, K.; YUDOH, K.; KOIZUKA, I.; KATO, T. Crosslinking of the CD69 molecule enhances S100A9 production in activated neutrophils. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 1, p. 87-98, 2007.

SHIMAOKA, M.; IKEDA, M.; LIDA, T.; TAENAKA, N.; YOSHIYA, I.; HONDA, T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 1, p. 307-311, 1996.

SIMARD, J. C.; GIRARD, D.; TESSIER, P. A. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 905-914, 2010.

SINHA, P.; OKORO, C.; FOELL, D.; FREEZE, H. H.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; SRIKRISHNA, G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 4666-4675, 2008.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985. Erratum in: **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 279, 1987.

SNEDECOR, G. M. **Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology.** Iowa: The Iowa State University Press, 1956.

SNEDECOR, G. M.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. Iowa: The Iowa State University Press, 1974.

SOHNLE, P. G.; HAHN, B. L.; SANTHANAGOPALAN, V. Inhibition of Candida albicans growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 6, p. 1369-1372, 1996.

SOPALLA, C.; LEUKERT, N.; SORG, C.; KERKHOFF, C. Evidence for the involvement of the unique C-tail of S100A9 in the binding of arachidonic acid to the heterocomplex S100A8/A9. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 12, p. 1895-1905, 2002.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 25, p. 1685-1690, 1995.

STEIN, C.; HASSAN, A. H.; PRZEWLOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 15, p. 5935-5939, 1990.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; SHIPPENBERG, T. S.; PETER, K.; HERZ, A. Peripheral opioid receptors médiating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 3, p. 1269-1275, 1989.

STEINBAKK, M.; NAESS-ANDRESEN, C. F.; LINGAAS, E.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; FAGERHOL, M. K. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. **Lancet**, v. 336, n. 8718, p. 763-765, 1990.

SU, Y. J.; XU, F.; YU, J, P,; YUE, D. S.; REN, X. B.; WANG, C. L. Up-regulation of the expression of S100A8 and S100A9 in lung adenocarcinoma and its correlation with inflammation and other clinical features. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 16, p. 2215-2220, 2010.

SYRBU, S. I.; WATERMAN, W. H.; MOLSKI, T. F.; NAGARKATTI, D.; HAJJAR, J. J.; SHA'AFI, R. I. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2334-2340, 1999.

TING, E.; GUERRERO, A. T. G.; CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**. v. 153, n. 5, p. 1043-1053, 2008.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VANDAL , K.; ROULEAU, P.; BOIVIN, A.; RYCKMAN, C.; TALBOT, M.; TESSIER, P. A. Blockade of S100A8 and S100A9 Suppresses Neutrophil Migration in Response to Lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**. v. 171, n. 5, p. 2602-2609, 2003.

VERRI JR, W. A. **Inter-relação e mecanismos envolvidos na indução hipernociceptiva mecânica e migração de neutrófilos pela IL-15**. 2006. 111 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; MAGRO, D. A.; GUERRERO, A. T. G.; VIEIRA, S. M.; CARREGARO, V.; SOUZA, G. R.; HENRIQUES, M. G. M. O.; FERREIRA, F. H.; CUNHA, F. Q. Targeting endothelin ET_A and ET_B receptors inhibits antigen-induced neutrophil migration and mechanical hypernociception in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, n. 3, p. 271-279, 2009.

VOGL, T.; TENBROCK, K.; LUDWIG, S.; LEUKERT, N.; EHRHARDT, C.; VAN ZOELEN, M. A. D.; NACKEN, W.; FOELL, D.; VAN DER POLL, T.; SORG, C.; ROTH, J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nature Medicine**. v. 13, n. 9, p. 1042-1049, 2007.

WAHBA, A.V.; BARNES, B.; LAZARUS, G. S. Labeling of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes with indium-111: a new method for the quantitation of in-vivo accumulation of PMNLs in rabbit skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 82, n. 2, p. 126-131, 1984.

WEISSMANN, G. Inflammation: Historical Perspective. In: GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 2. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1992. p. 5-10.

YEN, T.; HARRISON, C. A.; DEVERY, J. M.; LEONG, S.; IISMAA, S. E.; YOSHIMURA, T.; GECZY, C. L. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4812–4821, 1997.

YUI, S.; MIKAMI, M.; YAMAZAKI, M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 6, p. 650-658, 1995a.

YUI, S.; MIKAMI, M.; YAMAZAKI, M. Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudate cells: its identification as the calcium binding protein complex, calprotectin. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 3, p. 307-316, 1995b.

ZWADLO, G.; BRUGGEN, J.; GERHARDS, G.; SCHLEGEL, R.; SORG, C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 72, n. 3, p. 510-515, 1988.