CARINA CICCONI PACCOLA

**Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no
efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9
murina sobre a dor neuropática experimental**

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

Orientadora:

Dra. Renata Giorgi

São Paulo

2008

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

Helena Str
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
11.01.2008
conf. conforme os prefácios

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1945
FMVZ

Paccola, Carina Cicconi

Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental / Carina Cicconi Paccola. – São Paulo: C. C. Paccola, 2008.
184 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Giorgi.

1. Dor neuropática. 2. S100A9. 3. Antinocicepção. 4. Constrição crônica. 5. IEG. 6. TNF α I. Título.

ERRATA

PACCOLA, C. C. **Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental.** 2008. 184 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	2º	3ª	estudo experimental	<i>Desconsiderar a informação</i>
RESUMO	2º	4ª	C-terminal	C-terminus
ABSTRACT	2º	3ª	an experimental approach	<i>Desconsiderar a informação</i>

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 Protocolo para uso de animais em experimentação n° 206/05, sobre o projeto intitulado "Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental", sob a responsabilidade de Renata Giorgi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/04/2005.

São Paulo, 15 de abril de 2005.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PACCOLA, Carina Cicconi

Título: Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho, aos que
enfrentam diariamente as dificuldades que são
conseqüências da dor crônica.*

*Dedico ainda, à Dra. Renata Giorgi,
esperando que este trabalho contribua efetivamente
com um futuro promissor para sua linha de pesquisa.*

*E à Deus, que colocou a ciência a nossa
disposição para que, um dia, nos aproximemos da Sua
sabedoria.*

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – VPT-FMVZ-USP.

À Sílvia Ap. Sochiarelli Bracale, pela atenção e carinho de sempre.

Ao Dr. Jorge Camilo Flório, pelas sugestões e auxílio na análise estatística de dados aqui apresentados.

À Cristina Aurichi Mario, secretária da pós-graduação deste departamento.

À Comissão de Pós-Graduação (CPG) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, particularmente, à Cláudia, Joana e Dayse.

À Fundação Butantan.

Ao Instituto Butantan.

Ao Biotério Central do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos animais.

Aos animais de laboratório.

À Dra. Idá S. Sano-Martins, por permitir a realização deste trabalho no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

À todos que trabalham no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan: Neusa, Iracema, Neucely, Teresinha, Ângela, Dna. Alice, Juscelino, Nicolau, Luis, Diva e Anita.

Em especial à Dra. Renata Giorgi, a quem admiro pela inteligência e conhecimento, pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Dr. Marcelo L. Santoro por todas as “olhadinhas” em nossos textos em inglês.

À Dra. Yara Cury, da Unidade de Dor, por sua atenção e gentileza.

Ao Dr. Luis Juliano Neto e Dra. Maria Aparecida Juliano, do departamento de Biofísica do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal Paulista, pela síntese do peptídeo.

Aos que fazem parte do Laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Dani, Erika, Aninha, Mauro, Ale, Carol, Gabi, Marina, Mi, Dani, Hugo, Andréa, Rhowena, Rodrigo, Vivian, Julian, Guilherme e Carol.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto do pela orientação nos estudos de imuno-histoquímica, pela atenção e por ter disponibilizado o laboratório para a realização destes ensaios.

Ao técnico Adilson S. Alves, Dids, por tudo que me ensinou, por toda a ajuda durante o desenvolvimento dos ensaios de imuno-histoquímica, pela paciência, amizade e dedicação de looooongas horas de trabalho.

Ao Leandro e ao Glynton, do Centro de Diagnósticos Badiglian, pela compreensão e respeito por este trabalho.

Da mesma forma, pela equipe da Clínica Veterinária Ponta Porã, especialmente ao Dr. Paulo César Conelian e Dr. Aloísio Gelsi.

Falando de amigos...

Para falar nesse assunto não tem como começar por outro:

DEUS, a quem devo absolutamente TUDO e agradeço profundamente pelos amigos que colocou no meu caminho...

Pat, Kiko, Gi, Will, Thi, Ba, Lu, Camis, Tati, Bianca, Carol, Sandra Tomy, Cris, Flávio, Eli e Samy, do laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Vanessa P. Gutierrez, Van Gutcha, da Unidade de Dor do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por tudo que me ensinou, pela colaboração na técnica cirúrgica para constrição do nervo ciático, na técnica de estimulação tátil e em inúmeros experimentos. Por ouvir minhas longas histórias, por estar ao meu lado em tantos momentos importantes, pelo carinho de sempre, enfim, por ser uma AMIGA tão especial. Obrigada, obrigada, obrigada!

À Van Zambelli, por ser o cérebro desta Unidade de Dor, o que seria de nós sem você? O que seria de mim sem você? Amiga querida, obrigada por tudo!

À Rê Dias, dos sonhos intrigantes, pelo carinho e amizade.

À Maru, "inteligência brilhante", pela disposição em ajudar sempre.

À Rô, "geniozinho" dos "olhos de lince" e sinceridade absoluta, obrigada por tudo!

À Ing, talvez a única que entenda minhas "perfeccionices".

Ao Ju, por participar da minha vida há tanto tempo!

À Deça, amiga de longe que está sempre no meu coração.

À Sônia, pela teimosia em acreditar que posso melhorar, até quando eu mesma duvido!

A todos os amigos da "Nossa Casa", pelo carinho e sustentação.

Aggy, Mami, Chu, Paula e tantos outros...amigos de sempre!

Família...

Outro presente de Deus...

Agradeço a TODOS, que para minha felicidade são muitos, por trazerem tanta alegria à minha vida.

À Verena, por compreender nessa fase, a ausência da madrinha que tanto te ama!

Aos meus pais, Luiz Alberto e Célia, nada no mundo pode me fazer mais feliz do que ser filha de vocês! Vocês são, com toda certeza, o que há de mais precioso na minha vida! Uma lista de agradecimentos seria infinita...Mil vezes obrigada!

Aos meus irmãos, Camila e Vitor, por me darem mais dois irmãos, Lucas e Fernanda, e por estarem sempre ao meu lado!

Ao Carlos, com quem venho crescendo e aprendendo diariamente, obrigada pela compreensão, apoio e respeito por tudo que faço. Você...minha futura família...não sei descrever o que sinto!

RESUMO

PACCOLA, C. C. **Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental**: estudo experimental. [Evaluation of possible mechanisms involved in the antinociceptive effect of the C-terminal of the murine S100A9 on experimental neuropathic pain]. 2008. 184 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O peptídeo sintético idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) possui efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor inflamatória aguda. No presente estudo, o efeito do pS100A9m foi avaliado sobre a dor neuropática induzida pela constrição crônica (CCI) do nervo ciático em ratos. Ainda, foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. A nocicepção foi avaliada pelos testes de hiperalgesia, alodinia e dor espontânea. Os animais foram tratados com diferentes doses do pS100A9m pelas vias intraplantar, oral ou intratecal 14 dias após a CCI e a nocicepção avaliada após 1 hora. As três vias de administração bloquearam a hiperalgesia, a alodinia e a dor espontânea decorrentes da dor neuropática. A duração do efeito do pS100A9m varia de acordo com a via utilizada e com o fenômeno nociceptivo testado. Ainda, a injeção intraplantar do peptídeo, na pata contralateral à CCI, inibiu a hiperalgesia e a alodinia observadas após a constrição do nervo. Quando o pS100A9m foi administrado pela via intraplantar no 7º dia após a CCI, ele também induziu inibição da hiperalgesia inflamatória que é observada nesse período. Os prováveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do pS100A9m foram investigados pela administração de antagonistas de receptores de serotonina, noradrenalina, GABA (A e B) e opióides. Os resultados obtidos demonstraram que apenas o antagonista de receptor GABA_B reverteu completamente o efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática, detectada no 14º dia pós-cirúrgico. Além disso, foram avaliadas as expressões das proteínas Egr-1, Fos e TNF α na medula dos ratos submetidos à CCI e tratados com o peptídeo 7 ou 14 dias do procedimento cirúrgico. O aumento na expressão das proteínas Egr-1 e Fos foi evidenciado tanto no 7º como no 14º dia

após a CCI, em animais que não receberam nenhum tratamento ou aqueles que foram tratados com o veículo do peptídeo. Por outro lado, o pS100A9m inibiu a expressão destas duas proteínas no lado ipsolateral à CCI no corno dorsal da medula espinhal dos animais. Com relação ao $\text{TNF}\alpha$, apenas no 7º dia após a CCI foi detectado o aumento na expressão desta proteína. Ainda, foi neste período que o pS100A9m acarretou inibição da expressão do $\text{TNF}\alpha$ no corno ventral de animais submetidos ao procedimento cirúrgico. Estes resultados demonstram que o C-terminal da S100A9 murina inibe a dor neuropática experimental por uma ação dependente de receptores GABA_B , sugerindo que este peptídeo possivelmente promova uma ativação dos mecanismos inibitórios espinhais, acarretando em redução da ativação de neurônios na medula. Desta forma, o pS100A9m demonstra um potencial terapêutico para o tratamento de dores persistentes.

Palavras-chave: Dor neuropática. S100A9. Antinocicepção. Nervo ciático. Constrição crônica. C-terminal da S100A9. IEG. $\text{TNF}\alpha$.

ABSTRACT

PACCOLA, C. C. **Evaluation of possible mechanisms involved in the antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 on experimental neuropathic pain**: an experimental approach. [Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental]. 2008. 184 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The synthetic peptide identical to the C-terminus of murine S100A9 protein (mS100A9p) has antinociceptive effect on different acute inflammatory pain models. In this study, the effect of mS100A9p was evaluated on neuropathic pain induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats, and the possible mechanisms involved in this effect were investigated. Hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain were assessed to evaluate nociception. Rats were treated with different doses of mS100A9p by intraplantar, oral, or intrathecal routes on day 14 after CCI, and nociception was evaluated 1 hour later. These three routes of administration blocked hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain. The duration of mS100A9p effect depends on the route used and the phenomenon analyzed. Moreover, intraplantar injection of mS100A9p in the contralateral paw inhibited the hyperalgesia and allodynia induced by CCI. When mS100A9p was administered by intraplantar route on day 7 after CCI, it reversed the inflammatory hyperalgesia observed in this period. The mechanisms likely involved in the antinociceptive effect of mS100A9p were investigated by administration of antagonists of serotonin, norepinephrine, GABA (A and B) and opioid receptors. Only the GABA_B receptor antagonist completely reversed the antinociceptive effect of mS100A9p on neuropathic pain on day 14 after CCI. Besides, the expression of Egr-1, Fos and TNF α proteins was evaluated in the spinal cord of rats submitted to CCI and treated with mS100A9p on days 7 or 14 after CCI. The expression of Egr-1 and Fos was increased in animals not treated or treated with vehicle on days 7 and 14 after CCI. On the other hand, mS100A9p inhibited the expression of these two proteins in the dorsal horn of spinal cord ipsilateral to CCI. The increase in TNF α expression was observed exclusively on day 7 after CCI. In the same time period, mS100A9p

inhibited the expression of $\text{TNF}\alpha$ in the ventral horn of spinal cord of animals submitted to CCI. The results obtained herein demonstrate that the C-terminus of murine S100A9 protein inhibits the experimental neuropathic pain by a GABA_B -dependent action, suggesting that this peptide promotes the activation of spinal inhibitory mechanisms leading to the reduction of activation of spinal neurons. Therefore, mS100A9p demonstrates a potential therapeutic use in persistent pain syndromes.

Key words: Neuropathic pain. S100A9. Antinociception. Sciatic nerve. Chronic constriction injury. C-terminus S100A9. IEG. TNF.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Teste de pressão de pata.....	059
Figura 2 - Teste de estimulação tátil.....	060
Figura 3 - Teste de dor espontânea.....	061
Figura 4 - Efeito da administração do pS100A9m i.pl. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI.....	069
Figura 5 - Efeito da administração do pS100A9m p.o. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI.....	070
Figura 6 - Efeito da administração do pS100A9m i.t. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI.....	071
Figura 7 - Efeito da administração do pS100A9m i.pl. sobre a alodinia induzida pela CCI.....	073
Figura 8 - Efeito da administração do pS100A9m p.o. sobre a alodinia induzida pela CCI.....	074
Figura 9 - Efeito da administração do pS100A9m i.t. sobre a alodinia induzida pela CCI.....	075
Figura 10 - Efeito da administração do pS100A9m por via i.pl. (A), p.o. (B) ou i.t. (C) sobre a dor espontânea induzida pela CCI.....	077
Figura 11 - Duração do efeito da administração intraplantar (A), oral (B) ou intratecal (C) do pS100A9m sobre a hiperalgesia de ratos submetidos à CCI.....	080
Figura 12 - Duração do efeito da administração intraplantar (A), oral (B) ou intratecal (C) do pS100A9m sobre a alodinia de ratos submetidos à CCI.....	081
Figura 13 - Efeito da injeção intraplantar de pS100A9m (8µg/pata), no lado contralateral à CCI, sobre a hiperalgesia (A) e alodinia (B).....	083
Figura 14 - Efeito do pS100A9m (8µg/pata) i.pl. sobre a hiperalgesia induzida após 7 dias da CCI.....	085
Figura 15 - Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	087
Figura 16 - Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	088
Figura 17 - Efeito da administração de metisergida sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a de dor neuropática.....	090
Figura 18 - Efeito da administração de ioimbina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a de dor neuropática.....	092

Figura 19 -	Efeito da administração de bicuculina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a de dor neuropática.....	094
Figura 20 -	Efeito da administração de saclofen sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a de dor neuropática.....	096
Figura 21 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula espinhal de ratos 7 dias após a CCI.....	098
Figura 22 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Egr-1 na região do corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos.....	099
Figura 23 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula de ratos 14 dias após a CCI.....	100
Figura 24 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Egr-1 na região do corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos.....	101
Figura 25 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos 7 dias após a CCI.....	103
Figura 26 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Fos na região do corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos.....	104
Figura 27 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos 14 dias após a CCI.....	105
Figura 28 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Fos na região do corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos.....	106
Figura 29 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de TNF α na medula de ratos 7 dias após a CCI.....	108
Figura 30 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para TNF α na região do corno ventral da medula espinhal lombar de ratos.....	109
Figura 31 -	Efeito do pS100A9m sobre a expressão de TNF α na medula de ratos 14 dias após a CCI.....	110
Figura 32 -	Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para TNF α na região do corno ventral da medula espinhal lombar de ratos.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	antiinflamatórios não esteroidais
AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole proionic acid
ANOVA	análise de variância
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CCI	<i>chronic constriction injury</i>
CDME	corno dorsal da medula espinhal
CEUAIB	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CST	<i>complete sciatic transection</i>
DAB	diaminobenzidina
DNP	<i>diabetic neuropathic pain model</i>
e.p.m.	erro padrão da média
e.v.	via endovenosa
F.Op.	falso-operado
GABA	ácido γ -aminobutírico
His	histidina
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	via intraplantar
i.t.	via intratecal
IASP	International Association for the Study of Pain
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICTR	<i>inferior caudal trunk resection</i>
IEG	<i>immediate early gene</i>
LD	lado direito
LE	lado esquerdo
LPS	lipolissacarídeo
LTB ₄	leucotrieno B ₄

MIF	<i>Migration Inhibitory Factor</i>
MRP	<i>MIF Related Proteins</i>
NE	noradrenalina
NIF	<i>neutrophil-immobilizing-factor</i>
NK1	<i>neurokinin-1</i>
NK2	<i>neurokinin-2</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NO	<i>nitric oxid</i>
Op	operado
Op+P	operado mais peptídeo
Op+V	operado mais veículo
p.o.	via oral
PAG	<i>periaqueductal gray</i>
PAR ₂	<i>proteinase-ativated receptor-2</i>
PAR ₂ AP	<i>PAR₂-activating peptide</i>
PB	<i>phosphate buffer</i>
PBT	<i>phosphate buffer with Triton</i>
PFA 4%	paraformaldeído 4%
PHN	<i>postherpetic neuralgia model</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PN3/SNS	<i>tetrodotoxin-resistant sodium channel</i>
pS100A9m	peptídeo sintético idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina
PSL	<i>partial sciatic nerve ligation</i>
PVG	<i>periventricular gray</i>
RVM	<i>rostral ventromedial medulla</i>
SCI	<i>spinal cord injury</i>
SCN	<i>sciatic cryoneurolysis</i>
SIN	<i>sciatic inflammatory neuritis</i>
SIP	<i>sympathetically independent pain</i>
SMP	<i>sympathetically maintained pain</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNL	<i>spinal nerve ligation</i>
SNP	Sistema Nervoso Periférico

SP	substância P
TNF	fator de necrose tumoral
TNF α	fator de necrose tumoral- α
TST	<i>tibial and sural transection</i>
UNIFESP	Universidade Federal Paulista
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
δ	delta
κ	kappa
μ	mü
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	micrograma por microlitro
$\mu\text{l}/\text{g}$	microlitro por grama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/ml	miligrama por mililitro
ml/g	mililitro por grama
μg	micrograma
μl	microlitro
$\mu\text{g}/\text{animal}$	micrograma por animal
$\mu\text{g}/\text{pata}$	micrograma por pata
g	grama
g/s	grama por segundo
H_2O	água
HCl	ácido clorídrico
Log	logarítmico
M	Molar
$\%$	por cento
I	um
II	dois
III	três
IV	quatro
V	cinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	023
1.1	Dor: conceitos gerais.....	023
1.2	Fisiopatologia da dor.....	024
1.3	Sistema supressor de dor.....	028
1.4	Dor neuropática.....	033
1.5	Controle da dor neuropática.....	040
1.6	Modelos experimentais para indução de dor neuropática.....	045
1.7	Proteína S100A9.....	048
2	OBJETIVOS.....	054
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	056
3.1	Animais.....	056
3.2	Síntese e utilização do peptídeo homólogo à porção C-terminal da proteína ligante de cálcio S100A9 murina - pS100A9m.....	056
3.3	Planejamento geral.....	057
3.4	Produção da dor neuropática.....	058
3.5	Avaliação da nocicepção.....	058
3.5.1	<i>Hiperalgesia – Teste de pressão da pata.....</i>	<i>058</i>
3.5.2	<i>Alodinia – Teste de estimulação tátil.....</i>	<i>059</i>
3.5.3	<i>Dor espontânea.....</i>	<i>061</i>
3.6	Procedimento para tratamento intratecal.....	061
3.7	Tratamentos farmacológicos.....	062
3.8	Imuno-histoquímica.....	063
3.9	Análise estatística.....	065
4	RESULTADOS.....	067
4.1	Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a hiperalgesia induzida pela CCI.....	067
4.2	Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a alodinia decorrente da CCI.....	072
4.3	Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a dor espontânea observada após a CCI.....	076
4.4	Determinação do tempo de duração do efeito antinociceptivo do pS100A9m injetado pelas vias i.pl., p.o. ou i.t. sobre a hiperalgesia e a alodinia observadas 14 dias após a CCI.....	078
4.5	Efeito do pS100A9m injetado pela via i.pl. na pata contralateral à CCI 14 dias após a cirurgia.....	082
4.6	Efeito do pS100A9m injetado pela via i.pl. sobre a hiperalgesia observada no 7º dia após a CCI.....	084
4.7	Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	086

4.8	Efeito da administração de metisergida sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	089
4.9	Efeito da administração de ioimbina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	091
4.10	Efeito da administração de bicuculina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	093
4.11	Efeito da administração de saclofen sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática.....	095
4.12	Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula de ratos submetidos à CCI.....	097
4.13	Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos submetidos à CCI.....	102
4.14	Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de TNF α na medula de ratos submetidos à CCI.....	107
5	DISCUSSÃO.....	113
6	RESUMO DOS RESULTADOS.....	124
7	CONCLUSÕES.....	126
8	REFERÊNCIAS	128
9	ANEXOS.....	151

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor: conceitos gerais

Em 1986, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain – IASP*) conceituou dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões. A dor é sempre subjetiva e cada indivíduo aprende a utilizar este termo de acordo com suas experiências. A interpretação da sensação dolorosa envolve, portanto, além dos aspectos físico-químicos da nocicepção, componentes sócio-culturais do indivíduo e particularidades do ambiente onde o fenômeno nociceptivo é experimentado. Sendo assim, aspectos sensoriais, afetivos, culturais e emocionais compõem o fenômeno doloroso (TEIXEIRA; PIMENTA, 1994).

A dor também é considerada um sinal característico dos mecanismos normais de proteção do organismo contra danos teciduais (DRAY, 1997b). Uma das funções vitais do sistema nervoso é informar sobre ocorrência ou perigo de injúria. A sensação de dor contribui para esta função (RAJA et al., 1999; RIEDEL; NEECK, 2001) e está, portanto, relacionada com os comportamentos de fuga e esquia (PEDERSEN; SCHEEL-KRUGER; BLACKBURN-MUNRO, 2006).

Desta forma, é importante distinguir dor de mecanismos neurais de nocicepção. A nocicepção, não necessariamente, leva à percepção da dor. Esta percepção é produto da abstração do cérebro e da elaboração da informação sensorial que chega ao sistema nervoso central – SNC (MILLAN, 1999; BASBAUM; JESSELL, 2003; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

O processo de dor é uma experiência multidimensional que integra funções de estruturas límbicas e corticais para coordenar a resposta comportamental ao estímulo nociceptivo. O componente sensório-discriminativo compreende aspectos de localização, intensidade e modalidade de estímulos, o componente afetivo-motivacional que atribui conotação aversiva desagradável e o componente cognitivo-avaliativo possibilita quantificá-la e atribuir-lhe significado simbólico individual (TEIXEIRA, 2003; PEDERSEN; SCHEEL-KRUGER; BLACKBURN-MUNRO, 2006).

Em princípio, o fenômeno doloroso pode ser classificado em agudo ou crônico. A dor aguda tem função de alerta, segue-se à lesão tecidual, desaparece com a resolução do processo patológico e está associada a alterações neurovegetativas. A dor aguda pode tornar-se crônica, e esta última persiste além do tempo de cura de uma lesão ou está associada a um processo patológico crônico que causa dor contínua ou recorrente. Na dor crônica não ocorrem as respostas neurovegetativas e, em contraste com a dor aguda, não tem função de alerta e pode decorrer de fatores ambientais ou psicopatológicos (TEIXEIRA; PIMENTA, 1994).

As dores crônica e aguda diferem não só pelo início e duração, mas principalmente pelos mecanismos envolvidos em cada uma delas (WANG; WANG, 2003). A dor crônica, na maioria das vezes, gera estresse físico, emocional, econômico e social, além de incapacidade laborativa, alterações do sono, do apetite, da vida afetiva e do humor, causando principalmente depressão (TEIXEIRA; PIMENTA, 1994).

1.2 Fisiopatologia da dor

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias que possuem terminações livres nos tecidos periféricos (CAILLIET, 1993; RANG; DALE; RITTER, 1997). Elas não se localizam em uma estrutura anatômica específica, mas estão dispersas pelo corpo, innervando pele, músculos, articulações e vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Estas terminações nervosas livres são receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores, que são ativados por estímulos nocivos (CAILLIET, 1993), os quais podem ser térmicos, mecânicos ou químicos. Quando são ativados pelos três tipos de estímulos são chamados nociceptores polimodais (RAJA et al., 1999). Os nociceptores estão presentes nas fibras A δ , mielinizadas, que conduzem sinais rápidos e nas fibras C, não-mielinizadas, que conduzem sinais lentamente (RAJA et al., 1999; BASBAUM; JESSELL, 2003).

Ainda, sugere-se que além dos receptores polimodais, um grupo adicional de nociceptores, denominado receptores "silenciosos" (silent nociceptors), são ativados

durante processos inflamatórios, contribuindo para a transmissão aferente da dor articular e visceral (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; RAJA et al., 1999).

As fibras A β , mielinizadas e de grande diâmetro, respondem a estímulos inócuos que podem ser táteis, térmicos ou proprioceptivos (CAILLIET, 1993; JULIUS; BASBAUM, 2001). Elas contribuem para a percepção normal da qualidade dos estímulos e mesmo que não respondam diretamente a estímulos nocivos, a atividade dessas fibras não só modifica a percepção da dor, como também pode atenuá-la (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM; JESSELL, 2003).

Os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos fazem sinapses com outros neurônios, nas camadas superficiais do corno dorsal, os quais ascendem tanto pelas vias dorsais quanto pelas ântero-laterais da medula espinhal, chegando a diferentes regiões do tálamo, dando um caráter mais difuso à dor (CAILLIET, 1993; RANG; DALE; RITTER, 1997; JULIUS; BASBAUM, 2001).

O corno dorsal é subdividido em camadas (lâminas) distintas de acordo com as características citológicas de seus neurônios. A maioria dos neurônios da lâmina I responde exclusivamente a estímulos nocivos. A lâmina II é formada quase que exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem somente a aferências nociceptivas. As lâminas III e IV contêm neurônios que recebem aferências de fibras A β , respondendo predominantemente a estímulos não-nocivos. A lâmina V recebe aferências de fibras A β , A δ , C e também de estruturas viscerais. Essa convergência de aferências nociceptivas somáticas e viscerais na lâmina V pode explicar a “dor referida”, condição em que a dor resultante de um dano a uma estrutura visceral é deslocada para outra área da superfície corporal (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (CDME) podem ser: 1) neurônios de projeção, que levam a informação para estruturas supraespinhais e também ativam o sistema de controle descendente; 2) neurônios proprioespinhais, que transferem impulsos entre os segmentos da medula; 3) interneurônios inibitórios ou excitatórios, que transmitem informações a curtas distâncias na medula e regulam a ativação de neurônios do CDME (DOUBELL; MANNION; WOOLF, 1999).

A transmissão sináptica entre as fibras aferentes primárias e neurônios do CDME é mediada principalmente pelo glutamato, o qual ativa receptores tais como os AMPA (*α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole proionic acid*) e os NMDA (*N*-

methyl-D-aspartate). Além de neurotransmissores, diversas substâncias podem modular a transmissão sináptica na medula, dentre elas o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), prostaglandinas, ATP (*adenosine triphosphate*) e neuropeptídeos como a substância P (SP) (DOUBELL; MANNION; WOOLF, 1999).

Na medula espinhal, a transmissão dos sinais dolorosos, envolve a participação de canais iônicos (ALTIER; ZAMPONI, 2004), os quais são expressos nos neurônios sensoriais e sua ativação gera correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular causando excitação ou inibição neuronal. Os principais canais envolvidos nesse processo são os canais de sódio, canais de cálcio dependentes de voltagem e canais de potássio (LEE; LEE; OH, 2005).

As informações nociceptivas recebidas pelos neurônios sensoriais periféricos seguem por neurônios do trato ascendente, que ativam o sistema tálamo-cortical, produzindo a consciência da sensação de dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Cinco são as vias ascendentes envolvidas na transmissão da mensagem nociceptiva ao tálamo e córtex, os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espino-hipotalâmico (BASBAUM; JESSELL, 2003). No tálamo ocorre a recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (CRAIG; DOSTROVSKY, 1999). O córtex cerebral realiza o processamento da dor e os neurônios do córtex somatossensorio, do giro do cíngulo (sistema límbico) e do córtex insular (componente autonômico) estão envolvidos na resposta à nocicepção (BASBAUM; JESSELL, 2003).

A lesão tecidual periférica ou do sistema nervoso central ou periférico acarreta em ativação de fibras aferentes primárias e conseqüente aumento da excitabilidade de neurônios espinhais desenvolvendo o fenômeno denominado de sensibilização central (WOOLF, 1983; WOOLF; WALL, 1986). A sensibilização central se inicia por um estímulo que resulta na ativação de PKC (*protein kinase C*) ou tirosinoquinases, o que promove fosforilação de receptores NMDA resultando em aumento prolongado da atividade sináptica (DOUBELL; MANNION; WOOLF, 1999).

A sensibilização central, em geral, persiste tanto quanto o estímulo nociceptivo periférico, desaparecendo quando este diminui. Em alguns casos, porém, a sensibilização central pode durar mais que o processo nociceptivo periférico, ou seja, a dor central persiste mesmo quando o estímulo nociceptivo periférico desaparece (DWORKIN et al., 2003; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

O fenômeno de sensibilização central juntamente com a sensibilização periférica (TREEDE et al., 1992), medeiam os processos de hiperalgesia e alodinia. Enquanto o comportamento de fuga reflete o componente afetivo-motivacional da dor, a hiperalgesia e a alodinia refletem o componente sensório-discriminativo (PEDERSEN; SCHEEL-KRUGER; BLACKBURN-MUNRO, 2006).

A hiperalgesia, resposta excessiva a estímulos nocivos, envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas periféricas, quanto a sensibilização central (LEVINE; FIELDS; BASBAUM, 1993; DRAY; URBAN; DICKENSON, 1994). A hiperalgesia que ocorre no local da lesão é denominada primária, enquanto a que ocorre no tecido intacto ao redor da lesão é chamada secundária (RAJA et al., 1999).

Diversas substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, tais como cininas, eicosanóides, neuropeptídeos, citocinas, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, entre outros, podem interferir com a atividade das fibras sensoriais aferentes (FERREIRA, 1994). Estes mediadores atuam em receptores específicos gerando segundos mensageiros e ativando diretamente os nociceptores ou induzindo a diminuição do limiar de ativação dos nociceptores gerando hiperalgesia (CUNHA et al., 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; DRAY, 1995; 1997a).

Na vigência de estímulos nociceptivos de grande intensidade, como em casos de lesão de nervo periférico, a dor pode ser observada também em resposta a estímulos que usualmente não provocam dor (não nocivos), induzindo o fenômeno de alodinia (BESSON, 1999; KIDD; URBAN, 2001), que pode resultar tanto da sensibilização periférica, quanto da central (JULIUS; BASBAUM, 2001). Durante a alodinia, a sensibilização dos feixes nervosos sensoriais ascendentes torna-os susceptíveis à estimulação por mecanoreceptores (fibras A β), além dos nociceptores (WILLIS, 1993).

Alterações nas propriedades bioquímicas e na excitabilidade dos neurônios do CDME podem causar ainda o que se chama de dor espontânea (BASBAUM; JESSELL, 2003), a qual ocorre independente de estímulo e pode ser constante, com aspecto de queimação, ou intermitente, semelhante a choque elétrico (DWORKIN et al., 2003).

1.3 Sistema supressor de dor

A dor pode ser controlada por mecanismos centrais, uma vez que o sistema nervoso possui circuitos modulatórios que regulam a percepção da dor. O sítio inicial desta modulação é a medula espinhal, onde interconexões entre vias aferentes nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para centros supraespinhais (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Já em 1911, Head e Holmes postularam a existência de um sistema modulatório de dor descendente. Hipótese esta retomada com a elaboração da teoria da comporta, conceituada por Melzack e Wall (1965).

Segundo esta teoria, a inibição pré-sináptica das vias nociceptivas na medula espinhal decorre da colisão entre potenciais dos aferentes primários e potenciais antidrômicos negativos, originados por interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa do CDME. A ativação destes interneurônios geraria potenciais negativos, nas raízes sensoriais, reduzindo os potenciais nociceptivos que alcançam o CDME (MELZACK; WALL, 1965).

Desta forma, a dor pode ser modulada pelo equilíbrio da atividade das fibras aferentes primárias nociceptivas e não-nociceptivas, da seguinte maneira: neurônios da lâmina V recebem aferências excitatórias convergentes de fibras não-nociceptivas A β e fibras nociceptivas A δ e C; fibras A β inibem o disparo dos neurônios da lâmina V por ativação de interneurônios inibitórios na lâmina II; fibras A δ e C excitam neurônios da lâmina V e também inibem o disparo dos interneurônios inibitórios na lâmina II. Ou seja, as aferências não-nociceptivas “fecham” e as nociceptivas “abrem” um portão para transmissão central das informações nociceptivas (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Estruturas encefálicas também exercem atividade inibitória sobre as células do corno dorsal, o que se confirma quando a estimulação elétrica de regiões da substância cinzenta periaquedutal (*periaqueductal gray* – PAG) produz analgesia profunda e seletiva, sem comprometer outras formas de sensibilidade (REYNOLDS, 1969).

A existência de receptores opióides na amígdala, hipotálamo, PAG, tálamo e substância gelatinosa (KUHAR; PERT; SNYDER, 1973) e a constatação de que a PAG e a substância cinzenta periventricular (*periventricular gray* – PVG) estão

envolvidas com o efeito analgésico induzido pela morfina (LEWIS; GEBHART, 1977), contribuíram para confirmar a existência de um mecanismo supressor de dor.

A PAG recebe aferências de diferentes origens, tais como hipotálamo, córtex frontal e insular, amígdala, núcleo parafascicular do tálamo, núcleo cuneiforme, *locus ceruleus*, formação reticular e CDME. Ela possui muitos neurônios que contêm encefalina, SP e ácido γ -aminobutírico (GABA), alguns dos quais projetam-se para o bulbo ventromedial rostral (*rostral ventromedial medulla* – RVM) (SANDKUHLER, 1996; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). A conexão entre a PAG e o RVM é importante para a modulação da dor, uma vez que lesões do RVM impedem a analgesia induzida pela PAG (BEHBEHANI; FIELDS, 1979; URBAN; SMITH, 1994).

Dentre os núcleos do RVM envolvidos com os mecanismos supressores de dor destacam-se o núcleo magno da rafe, rico em neurônios serotonérgicos, e os neurônios da formação reticular que recebem projeções da PAG, hipotálamo posterior e *locus ceruleus*, rico em neurônios noradrenérgicos (ROSENFELD, 1994; SANDKUHLER, 1996; FIELDS; BASBAUM, 1999; MASON, 2001). Os neurônios do RVM projetam-se para a medula espinhal, onde inibem a transmissão nociceptiva (BASBAUM; FIELDS, 1978; WILLIS, 1988; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991).

Estímulos nociceptivos de baixa intensidade podem ativar estes circuitos antinociceptivos espinhais via projeções descendentes serotonérgicas e noradrenérgicas (RIEDEL; NEECK, 2001).

Em síntese, a via descendente envolve neurônios da PAG que projetam-se diretamente para o CDME, e outros que fazem conexões excitatórias com neurônios do RVM (principalmente neurônios serotonérgicos no núcleo magno da rafe); neurônios desse núcleo projetam-se para a medula e fazem conexões inibitórias com neurônios das lâminas I, II e V do corno dorsal. Além disso, neurônios noradrenérgicos do *locus ceruleus* e de outros núcleos do bulbo e ponte bloqueiam neurônios eferentes das lâminas I e V por ações inibitórias diretas e indiretas. Esses mecanismos também interagem com circuitos que têm opióides endógenos no CDME (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Considerando as diferentes estruturas neurais envolvidas no mecanismo de supressão da dor, podemos concluir que esta via possui três componentes principais: 1) neurônios da PAG e PVG, que fazem conexões excitatórias no RVM; 2) neurônios do RVM que fazem conexões inibitórias com neurônios do CDME e, 3) circuitos

locais no CDME que modulam a via inibitória descendente (BASBAUM; JESSELL, 2003; SUZUKI et al., 2004).

O CDME é o local onde neurônios eferentes serotonérgicos e/ou noradrenérgicos fazem sinapses com neurônios de projeção e interneurônios inibitórios encefalinérgicos (BASBAUM; JESSELL, 2003; SUZUKI et al., 2004). Ainda, é nesta região onde a ativação de interneurônios gabaérgicos inibe a liberação de neurotransmissores nociceptivos excitatórios, como glutamato, SP e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* –CGRP), por neurônios de projeção (MALCANGIO; BOWERY, 1996).

Desta forma, interneurônios inibitórios atuam contra o fluxo de sinais nociceptivos e o ácido γ -aminobutírico, principal neurotransmissor inibitório do SNC, atua inibindo tanto dores agudas como persistentes. A ativação destes interneurônios pode ser mimetizada por agonistas de receptores gabaérgicos, como o baclofen, reduzindo da mesma forma a liberação de neurotransmissores pelos aferentes nociceptivos (RIEDEL; NEECK, 2001).

O GABA está envolvido com a antinocicepção espinhal (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004) e é encontrado em altas concentrações nas lâminas I-III do CDME (PATEL et al., 2001). Nas lâminas I e II há grande distribuição de receptores benzodiazepínicos (GABA-A_{1a}) e opióides, o que ressalta a capacidade destas regiões em modular a nocicepção, levando à analgesia em resposta a estímulos nociceptivos de forte intensidade. A co-localização de GABA com acetilcolina, encefalina ou glicina em diferentes subpopulações de interneurônios do CDME constituem mais um princípio modulatório da nocicepção (RIEDEL; NEECK, 2001).

Os neurônios gabaérgicos encontrados nas lâminas I-III são, principalmente, interneurônios inibitórios. Nas camadas superficiais do CDME estão presentes tanto os receptores GABA_A ionotrópicos, quanto os GABA_B metabotrópicos (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004). Outro tipo de receptor ionotrópico gabaérgico é o GABA_C, que é farmacologicamente distinto dos outros dois (BORMANN; FEIGENSPAN, 1995; CHEBIB; JOHNSTON, 1999; CHEBIB, 2004) e encontrado predominantemente em neurônios da retina (BORMANN; FEIGENSPAN, 1995).

Os receptores GABA_A são expressos em terminais aferentes primários e interneurônios e o bloqueio destes receptores produz sensibilização central (PATEL et al., 2001). Eles possuem diversos sítios de ligação para compostos como

benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e certos anestésicos voláteis (DARLISON; PAHAL; THODE, 2005).

A administração de agonista de receptor GABA_A reduz tanto o comportamento de fuga, quanto a alodinia e hiperalgesia mecânicas após lesão de nervo periférico (PEDERSEN; SCHEEL-KRUGER; BLACKBURN-MUNRO, 2006), situação em que a ativação destes receptores diminui a expressão e função de receptores AMPA espinhais (LIM et al., 2006).

Os receptores GABA_B estão localizados, pelo menos em parte, nos terminais aferentes primários sensíveis à capsaicina, nos quais sua ativação leva a inibição da atividade de fibras C e da liberação de glutamato e SP. Também estão localizados no corno ventral da medula onde possuem efeito inibitório sobre motoneurônios (PATEL et al., 2001).

A ativação de receptores GABA_B leva a inibição da liberação de mediadores pré-sinápticos e à inibição da atividade neuronal pós-sináptica (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004). Estes receptores são conhecidos por controlar a excitabilidade neuronal e modular a neurotransmissão sináptica, tendo papel muito importante em muitas atividades fisiológicas. Além disso, são amplamente expressos e distribuídos no sistema nervoso e estão envolvidos com desordens neurodegenerativas e fisiopatológicas incluindo epilepsia, espasticidade, dor crônica, depressão, esquizofrenia e dependência (ONG; KERR, 2005).

A ativação do sistema gabaérgico espinhal regula negativamente o processamento nociceptivo na medula, sugerindo um importante papel deste sistema no balanço entre os elementos espinhais excitatórios e inibitórios após lesão de nervos periféricos (LIM et al., 2006). Ainda, a inibição farmacológica do tônus gabaérgico intrínseco, em ratos normais, resulta em alodinia mecânica e hiperalgesia térmica (MALAN; MATA; PORRECA, 2002).

Além do GABA, os peptídeos opióides contribuem para o sistema de controle endógeno da dor. Estes peptídeos endógenos (encefalinas, β -endorfina e dinorfinas) e seus receptores (μ , κ e δ) estão localizados em pontos estratégicos no sistema de modulação de dor, tanto central quanto periférico. Os opióides regulam a transmissão nociceptiva por meio de ações inibitórias pós e pré-sinápticas (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Receptores opióides são sintetizados em neurônios nociceptivos periféricos e transportados para as terminações periféricas e centrais destas fibras. Tanto

receptores opióides, quanto os NMDA têm grande representação no CDME (lâmina II), sugerindo uma relação funcional entre eles. O que se confirma por estudos que demonstram que os opióides direta ou indiretamente modulam receptores NMDA (RIEDEL; NEECK, 2001).

O efeito inibitório de opióides nos neurônios de projeção do CDME depende das atividades gabaérgicas e glicinérgicas (CHEN; CHEN; PAN, 2005).

Sabe-se ainda que a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos produz antinocicepção e analgesia (REDDY; MADERDRUT; YAKSH, 1980; YAKSH, 1985; NAM et al., 2000), da mesma forma que o bloqueio dos receptores α_1 (NAM et al., 2000).

Quando ocorre uma lesão de nervo periférico, há uma ativação do sistema descendente noradrenérgico, gerando aumento na liberação central de noradrenalina (*locus ceruleus*) e aumento de impulsos inibitórios descendentes para CDME da medula por axônios noradrenérgicos. A noradrenalina (NE) liberada no CDME pode modular a transmissão sensorial por mecanismos pré e pós-sinápticos. A ativação dos adrenoceptores α_2 acarreta em hiperpolarização e inibição da transmissão do impulso, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (MA; EISENACH, 2003).

Ainda, tem sido atribuído um papel antinociceptivo a interneurônios colinérgicos, via receptores muscarínicos e nicotínicos, e a interneurônios opioidérgicos contendo encefalinas ou dinorfina, via receptores opióides μ , κ e δ (RIEDEL; NEECK, 2001).

O córtex cerebral é capaz de ativar o sistema inibitório descendente da dor (HAGBARTH; KERR, 1954; OHARA; VIT; JASMIN, 2005). Contudo, diferentes estudos em humanos e animais demonstram que uma inibição ou lesão de área cortical produz analgesia (BERTHIER; STARKSTEIN; LEIGUARDA, 1988; BURKEY; CARSTENS; JASMIN, 1999). Há evidências de que ramificações colaterais do trato córtico-espinhal oriundas do córtex motor e áreas do córtex sensorial exercem atividade inibitória nos neurônios do CDME (CARPENTER; LUNDBERG; NORRSELL, 1962; FETZ, 1968; SENAPATI; HUNTINGTON; PENG, 2005). No entanto, a atividade do córtex cerebral e das suas projeções para estruturas envolvidas na antinocicepção ainda é pouco conhecida.

De forma geral, a modulação da dor é um processo fisiológico importante que utiliza uma rede de comunicação do SNC envolvendo liberação de peptídeos opióides, aminas biogênicas e outros transmissores. A expressão de diversos padrões de experiência nociceptiva revela a plasticidade do sistema nervoso e a sabedoria do corpo em tentar preservar a homeostase em um ambiente nocivo (RIEDEL; NEECK, 2001).

1.4 Dor neuropática

Segundo a IASP, a dor neuropática é aquela iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso (BACKONJA, 2003). Esta definição vem sendo questionada atualmente, principalmente pelo caráter amplo e inespecífico dos termos lesão e disfunção (BACKONJA, 2003; BENNETT, 2003).

De qualquer forma, sabe-se que a lesão de nervo em humanos resulta, muitas vezes, em dor neuropática, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de hiperalgesia e alodinia (PAYNE; NORFLEET, 1986).

Contribuindo para o desenvolvimento da dor neuropática, ocorrem alterações no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinhal, as quais incluem a formação de impulsos ectópicos que sensibilizam os neurônios do CDME e mantém os impulsos aferentes para o SNC (DEVOR; WALL, 1990; GRACEY; LYNCH; BENNETT, 1992; ROBERTS, 1999).

Alguns autores acreditam que a dor não seja induzida pelas fibras nervosas lesadas propriamente ditas, mas pelas fibras vizinhas intactas (SCHAIBLE; RICHTER, 2004). De qualquer forma, sugere-se que canais de sódio dependentes de voltagem PN3/SNS (*tetrodotoxin-resistant sodium channel*) sejam os responsáveis pela manutenção dos impulsos ectópicos aferentes (PORRECA et al., 1999).

As fibras A β , normalmente envolvidas na transmissão dos impulsos não nocivos, são as que apresentam maior quantidade de impulsos ectópicos na vigência de lesão em nervo periférico. Estas fibras enviam projeções colaterais para o CDME da medula espinhal. Estes fatos, associados à sensibilização central,

contribuem para o desenvolvimento da dor espontânea, da hiperalgesia e da alodinia (DEVOR; SELTZER, 1999; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Diferentes mecanismos são considerados como geradores de potenciais ectópicos, tais como: mudanças na expressão dos canais iônicos, ativação de axônios por mediadores inflamatórios e de fibras lesadas pelo sistema nervoso simpático (ZIMMERMANN, 2001; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Os mediadores inflamatórios como bradicinina, óxido nítrico (*nitric oxid* - NO) e citocinas podem originar-se de leucócitos ou células de Schwann presentes ao redor da fibra lesada (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

No tecido normal, o sistema nervoso simpático não ativa fibras aferentes primárias. Em casos de lesão de nervo, porém, estas fibras aferentes tornam-se sensíveis a mediadores adrenérgicos (DWORKIN et al., 2003; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Assim sendo, considera-se que existem dois tipos de dor neuropática (ROBERTS, 1986): a dor mantida pela atividade simpática (*sympathetically maintained pain* – SMP) e a dor independente desta atividade (*sympathetically independent pain* – SIP).

Sugere-se que neurônios sensoriais na região da lesão apresentam aumento da responsividade à adrenalina circulante ou NE liberada das terminações simpáticas pós-ganglionares (DEVOR; SELTZER, 1999). Os estudos dos mecanismos envolvidos nesta sensibilidade têm mostrado que a lesão de nervo induz a emergência de fibras simpáticas no gânglio da raiz dorsal, aumentando a quantidade de NE liberada nos neurônios aferentes hiperresponsivos (MCLACHLAN et al., 1993; SMALL; SCADDING; LANDON, 1996).

Adrenoceptores α_2 e α_1 participam desses mecanismos (SATO; PERL, 1991; CHEN et al., 1996) e a interação de agonistas adrenérgicos a estes adrenoceptores na membrana celular dos neurônios é responsável, nos casos de SMP, pela origem das descargas ectópicas (DEVOR; GOVRIN-LIPPMANN, 1983).

Após uma lesão parcial de nervo os nociceptores intactos adjacentes às fibras lesadas desenvolvem sensibilidade à NE, que é mediada pela expressão de receptores α_1 -adrenérgicos nas suas terminações. Essa sensibilização adrenérgica pode estar relacionada com a liberação de neuropeptídeos pelas terminações nociceptivas lesadas, que induzem inflamação neurogênica. Ainda, alguns autores

relatam que enquanto a ativação dos α_1 está relacionada a nocicepção, a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos induz antinocicepção (NAM et al., 2000).

Em terminações nervosas lesadas ocorre a expressão de diversos receptores, tais como, receptores para histamina, serotonina, bradicinina, fator de necrose tumoral- α (TNF α), prostaglandinas e adrenoceptores α_1 e α_2 . Estes receptores podem ser expressos por fibras normais, porém, em casos de lesão de nervo, eles sofrem alterações que induzem sensibilização e medeiam as sensações do processo de dor neuropática (ZIMMERMANN, 2001).

Estímulos produzidos por potenciais de ação ectópicos ou de alta intensidade e frequência promovem a liberação de neurotransmissores excitatórios como SP e glutamato. A SP ativa receptores específicos, NK1 (*neurokinin-1*) e NK2 (*neurokinin-2*), que estão relacionados com a hiperalgesia. O glutamato atua sobre receptores AMPA e cainato, promovendo uma despolarização persistente e aumento da excitabilidade. As fibras C emitem impulsos repetidos, que produzem despolarização persistente ou sensibilização central, de modo que o limiar de dor diminui e amplas descargas centrais são geradas diante de pequenos estímulos periféricos. Esses mecanismos em conjunto, contribuem para a cronificação da dor (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

Receptores AMPA pré-sinápticos em terminais gabaérgicos podem ter um papel bi-direcional na atividade neuronal no CDME e contribuir para os mecanismos de sensibilização central e hiperalgesia (LIM et al., 2006).

Para que ocorra o fenômeno de alodinia, no qual, estímulos inicialmente não dolorosos sejam percebidos como tal, ocorrem mudanças ao longo de toda a via nociceptiva, tais como a reorganização central das vias aferentes e perda dos mecanismos inibitórios (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

Essa reorganização central ocorre de tal forma que as fibras A β passam a inervar a lâmina II da medula espinhal, transmitindo os estímulos táteis como dolorosos (CAVIEDES; HERRANZ, 2002; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). A ramificação e invasão das fibras A β na lâmina II depende da ação de uma enzima que degrada matriz extracelular (MT5-MMP), e a deficiência desta enzima inibe o desenvolvimento da alodinia em animais submetidos a modelo de dor neuropática (KOMORI et al., 2004).

Há evidências de que a dor neuropática ocorra, em parte, pela ineficiência do sistema inibitório endógeno, pela falha tanto da inibição descendente, quanto do sistema opióide (ZIMMERMANN, 2001), ou seja, a lesão parcial de nervos resulta em perda de sinapses inibitórias gabaérgicas e opioidérgicas na medula espinhal (LEE et al., 2007).

Contribuindo com a perda destes mecanismos inibitórios, as lesões periféricas das fibras C fazem diminuir a liberação de GABA pelos neurônios inibitórios espinhais. Além disso, há diminuição na liberação de serotonina e NE pelos neurônios inibitórios descendentes. Dessa maneira, predomina a atividade de receptores AMPA/cainato e o estímulo excitatório é conduzido e amplificado até estruturas nervosas superiores (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

Enquanto alguns estudos demonstram que após lesão de nervo não há diminuição no número de receptores GABA_B, nem da afinidade por estes receptores, outros estudos descrevem diminuição do número de sítios de ligação dos receptores GABA_B na lâmina II da medula. Além disso, sabe-se que a lesão de fibras aferentes primárias pode levar à degeneração de neurônios espinhais e que o número de células imuno-reativas ao GABA nas lâminas I-III da medula diminui após este tipo de lesão (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004).

A plasticidade do sistema gabaérgico espinhal contribui para as respostas nociceptivas alteradas, associadas com processos de dor neuropática ou inflamatória (SOKAL; CHAPMAN, 2003). Níveis alterados de GABA na medula contribuem para a indução da dor neuropática, uma vez que ela pode ser permanentemente revertida com a administração intratecal de altas doses desse neurotransmissor (EATON; MARTINEZ; KARMALLY, 1999).

Além disso, a morte de interneurônios inibitórios nas lâminas I-III do CDME da medula de ratos submetidos à dor neuropática, contribui com a hiperexcitabilidade central que ocorre tanto na hiperalgesia, quanto na alodinia neuropáticas (NACHEMSON; BENNETT, 1993).

Seja qual for a etiologia da dor neuropática (pós-herpética, traumática, diabética, cirúrgica ou outra), são produzidas diversas alterações na via somatosensória que persistem mesmo quando a causa desaparece (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). Estas alterações consistem em mudanças na despolarização e na liberação de neurotransmissores e reorganização das sinapses (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; ZIMMERMANN, 2001).

As alterações de longa duração no sistema nervoso implicam em modificação na expressão gênica nas células nervosas e esse processo pode ser avaliado pelo estudo da expressão dos chamados “genes de resposta imediata” (*immediate early genes* – IEGs) (ZIMMERMANN, 2001) que são utilizados para monitorar a atividade de neurônios espinhais. Os mais conhecidos destes genes são os membros das famílias *fos* (*c-fos*, *fos B*, *fra-1*, *fra-2*), *jun* (*c-jun*, *jun B*, *jun D*) e *krox* (*krox-20*, *krox-24*), cujos produtos de transcrição são proteínas nucleares que ligam sinais extracelulares de curta duração com alterações fenotípicas prolongadas, pela modulação da transcrição de outros genes (LANTERI-MINET et al., 1993).

Zif268, Egr-1, NGFI-A, Krox-24, TIS8 e ZENK são denominações que se referem à mesma proteína regulatória de transcrição, produto de um IEG (KNAPSKA; KACZMAREK, 2004).

Estudos demonstram que o processamento sensorial na medula espinhal durante inflamação aguda ou crônica pode ser monitorado pela expressão de *fos B*, *c-fos*, *egr-1*, *jun D*, *jun B* e *c-jun* (LANTERI-MINET et al., 1993).

Diversas condições fisiológicas e patológicas podem levar à ativação desses genes de transcrição no sistema nervoso. Estímulos nocivos resultam no aumento da ativação de *c-fos*, *c-jun* e *egr-1* no CDME. Esta ativação permanece durante dias ou semanas, indicando alterações profundas na bioquímica e função das células nervosas, que podem estar relacionadas com os mecanismos centrais durante o desencadeamento da dor crônica. Desta forma, um padrão de sinalização neuropática, constituído de múltiplos componentes elétricos e bioquímicos anormais, induz a ativação destes genes no CDME com subseqüentes alterações transcricionais, bem como outros processos de neuroplasticidade. Como seqüelas funcionais observa-se sensibilização neuronal, apoptose de neurônios do CDME e perda da inibição espinhal. Ainda, acredita-se que as alterações nas transcrições gênicas sejam induzidas, principalmente, pelo glutamato, mas também por NO, prostaglandinas e citocinas (ZIMMERMANN, 2001).

A ativação de *egr-1*, bem como a de outros IEGs, encontra-se aumentada em resposta a diversos estímulos nocivos e sugere-se que este fator de transcrição tem papel seletivo em respostas comportamentais nociceptivas relacionadas à dor inflamatória persistente, mas não à estímulo nocivo agudo (KO et al., 2005). Por outro lado, a administração aguda do peptídeo agonista de receptor ativado por

protease do tipo 2 (*PAR₂-activating peptide* – PAR₂AP) induz aumento na expressão de Egr-1 no CDME de ratos (DALE et al., 2006a).

No final da década de 80, foi demonstrado que o gene *c-fos* e a proteína Fos, produto de sua expressão, aparecem em altas concentrações em neurônios do CDME de ratos submetidos a estímulo nocivo periférico, o que proporcionou o uso da avaliação da expressão desta proteína como ferramenta para o estudo da nocicepção. Cabe ressaltar, que a ausência de expressão de Fos não pode ser considerada como ausência de atividade neural, bem como que sua expressão não é específica a estímulos nociceptivos (HARRIS, 1998).

Porém, o produto da ativação do *c-fos* tem sido utilizado como um marcador de ativação neural relacionado a dor e diversos estudos têm avaliado a interligação entre sua expressão na medula espinhal e a hiperalgesia (KAWAHARA et al., 2001).

Ainda, a hiperalgesia persistente resultante do modelo de constrição crônica do nervo ciático, aparece juntamente com o aumento da expressão de Fos no lado ipsolateral da medula espinhal na região lombar (KAWAHARA et al., 2001).

Além das alterações na expressão destas proteínas nucleares em neurônios do sistema nervoso durante a nocicepção, a ativação ou desequilíbrio de citocinas está envolvida em uma variedade de processos patológicos (SOMMER; KRESS, 2004), inclusive na geração da dor (OKAMOTO et al., 2001; SOMMER; KRESS, 2004).

Após uma lesão de nervo, as citocinas atuam como ativadores precoces de uma cascata que culmina com a expressão final de mediadores comuns na transmissão da dor, como glutamato e NO. Além disso, é possível que citocinas pró-inflamatórias causem diretamente a sensibilização de nervos periféricos. Desta forma, sugere-se que a ativação imune medeia a nocicepção em casos de dano ao sistema nervoso (DELEO; COLBURN; RICKMAN, 1997).

O TNF α é considerado uma citocina pró-inflamatória, já que quando liberado após lesão ou durante inflamação, tem papel importante no início da cascata de ativação de outras citocinas e fatores de crescimento. Esta cascata de ativação resulta na liberação de prostanóides e catecolaminas (SOMMER; KRESS, 2004).

Assim, estudos sobre a fisiopatologia da dor neuropática sugerem que o TNF α participa desse processo, por mecanismos que envolvem tanto o sistema nervoso periférico quanto o central (ZIMMERMANN, 2001).

Os níveis de $TNF\alpha$ no nervo ciático de ratos submetidos à constrição deste nervo aparecem elevados nos primeiros dias após a lesão, voltando a níveis normais no 14º dia, indicando que ele contribui com o início da dor neuropática neste modelo (GEORGE et al., 1999; GEORGE; BUEHL; SOMMER, 2004). Por outro lado, foi demonstrado o aumento da expressão de $TNF\alpha$ no nervo ciático de ratos, 14 dias após a cirurgia para indução de dor neuropática, acompanhado da diminuição do limiar nociceptivo dos animais sugerindo que ele contribui com a manutenção da dor neuropática no modelo da constrição crônica do nervo ciático (OKAMOTO et al., 2001).

Ainda, a inibição da liberação de $TNF\alpha$, por inibidor de metaloprotease, está relacionada com a redução do comportamento associado à dor após lesão de nervo periférico, demonstrando que esta citocina medeia a hiperalgesia na dor neuropática (SOMMER et al., 1997).

Alguns estudos demonstram que no modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático, o TNF, centralmente, regula a liberação de NE (IGNATOWSKI et al., 1996; IGNATOWSKI et al., 1997; IGNATOWSKI et al., 2005), neurotransmissor que participa da via inibitória de dor (BASBAUM; JESSELL, 2003). Desta forma, no início do processo de instalação da dor, o TNF está envolvido com o aumento da percepção de dor, enquanto que em etapas mais avançadas participa da diminuição da dor. Inicialmente, o TNF inibe a liberação de NE, durante o desenvolvimento da hiperalgesia e, posteriormente, facilita a liberação de NE, durante o desaparecimento deste fenômeno (IGNATOWSKI et al., 2005).

Nesse contexto de regulador da liberação de NE, foi demonstrado que o TNF de origem central tem papel importante tanto na percepção fundamental da dor quanto na patologia da dor neuropática (IGNATOWSKI et al., 1999). Ainda, que está envolvido com o mecanismo de alterações neuroplásticas que participa da patogenia da dor persistente (COVEY et al., 2000; COVEY et al., 2002).

Em resumo, pode-se considerar que durante a dor neuropática ocorrem diversas alterações periféricas e centrais, as quais incluem descargas ectópicas e espontâneas, transmissão cruzada, alterações na expressão de canais iônicos, sensibilização dos nociceptores, ramificação colateral de neurônios aferentes primários e de neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal, sensibilização central,

reorganização das sinapses na medula espinhal e no córtex cerebral e alterações na via inibitória descendente de dor (BRIDGES; THOMPSON; RICE, 2001).

1.5 Controle da dor neuropática

Quando se considera a complexidade do processo de dor neuropática, torna-se compreensível a dificuldade clinicamente encontrada no seu tratamento, uma vez que pouco se compreende ainda sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (ALEY; LEVINE, 2002; CAVIEDES; HERRANZ, 2002; ERICHSEN; BLACKBURN-MUNRO, 2002; SAH; OSSIPO; PORRECA, 2003).

Dentre os complexos aspectos neuromoleculares envolvidos na dor neuropática, as emoções afetam os mecanismos periféricos de transmissão pelo sistema límbico, tratos descendentes para o CDME e tratos ascendentes para o tálamo e o córtex. As emoções abrangem três tipos de informações: a informação perceptiva, que indica a importância dos danos e suas seqüelas; a informação motivacional, que provoca a reação do paciente; e a informação cognitiva, que envolve experiências anteriores. Esse mecanismo envolve ansiedade, ódio, depressão e outros fatores, que o tratamento da dor crônica deve levar em consideração (CAILLIET, 1993).

Em função disso, diversas opções terapêuticas vêm sendo desenvolvidas para o controle da dor neuropática (GALER, 1995), contudo, na maioria dos casos a resposta dos pacientes ainda não é satisfatória. Estes tratamentos incluem antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos locais, agentes tópicos, analgésicos narcóticos ou não-narcóticos, antiarrítmicos, lesões neurocirúrgicas e outros (GALER, 1995; ATTAL, 2000; CAVIEDES; HERRANZ, 2002; SAH; OSSIPO; PORRECA, 2003).

A resposta aos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e opióides é freqüentemente pobre (WANG; WANG, 2003). Atualmente, antidepressivos e anticonvulsivantes são os fármacos mais importantes para o tratamento da dor neuropática. Os antidepressivos atuam aumentando a NE e a serotonina nas vias descendentes da medula, enquanto os anticonvulsivantes modulam a transmissão

dos impulsos nervosos durante a sensibilização periférica, o que pode ser explicado pela grande similaridade entre a transmissão dos impulsos na sensibilização e na epilepsia (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

A carbamazepina, um fármaco anticonvulsivante, atua no SNC diminuindo a excitabilidade neuronal e no SNP antagonizando os potenciais de ação gerados nos canais de sódio e potássio (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). A inibição da dor por este fármaco provavelmente ocorre em função da sua habilidade em bloquear a condutância de íons, o que faz suprimir a atividade de fibras A δ e C, sem afetar a condução normal do impulso (BACKONJA, 2002).

Alguns ensaios clínicos têm mostrado ação analgésica para agonistas GABA (FROMM, 1994; MELLICK; MELLICK, 1997) e antagonistas de receptores NMDA, como quetamina (FELSBY et al., 1996). A utilização de agonistas α_2 -adrenérgicos, como clonidina, em casos de dores não dependentes da atividade simpática, também tem sido preconizada (ZEIGLER et al., 1992; BOSWELL et al., 1997). Estudos em animais submetidos à dor neuropática demonstram que o efeito antinociceptivo da clonidina é mediado pela ativação seqüencial, na medula espinhal, da via receptores adrenérgicos α_2 – receptores muscarínicos – NO (TSAI; WON; LIN, 2000).

A gabapentina, estruturalmente análoga ao GABA, não possui ação gabaérgica direta, nem afeta a captação ou o metabolismo do GABA, o que se sugere é um efeito sobre canais de cálcio. De qualquer forma, estudos relatam além da melhora dos sinais de dor neuropática em pacientes tratados com este fármaco, poucos e bem toleráveis efeitos adversos (BACKONJA, 2002).

Sugere-se ainda que uma intervenção precoce que restabeleça os níveis de GABA espinhais possa prevenir o desenvolvimento da dor neuropática após lesão de nervo (EATON; MARTINEZ; KARMALLY, 1999).

O aumento de sensibilidade à dor observado na dor neuropática é produzido pela perda do tônus gabaérgico, sendo assim, a administração intratecal exógena de agonista de receptores GABA_A ou GABA_B reverte a alodinia e a hiperalgesia induzidas por lesão de nervo espinhal. Ainda, foi demonstrado que o agonista de GABA_A produziu inibição específica de hiperalgesia e alodinia, enquanto o agonista de GABA_B inibiu ambos os fenômenos e também aumentou o limiar térmico em ratos com lesão de nervo, sugerindo que agonistas de receptor GABA_A espinhal podem

proporcionar uma terapia mais específica para a dor neuropática (MALAN; MATA; PORRECA, 2002).

Agentes modulatórios do receptor GABA_A são geralmente utilizados para tratar ansiedade, epilepsia e distúrbios do sono e são geralmente eficazes, seguros e bem tolerados (NUTT, 2006).

Os benzodiazepínicos ativam receptores GABA_A, reduzindo a liberação de transmissores excitatórios pré-sinápticos e a atividade excitatória pós-sináptica em neurônios do corno dorsal. O Midazolan, agonista benzodiazepínico de receptor GABA_A, reduz os comportamentos de dor neuropática (LIM et al., 2006).

O Baclofen, um agonista específico do receptor metabotrópico GABA_B, exibe efeito analgésico em modelos de dor, provavelmente por inibição da liberação de glutamato por fibras A e C na substância gelatinosa e/ou pela diminuição da expressão de receptor NK-1 no CDME (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004). Este fármaco é administrado na medula espinhal para o tratamento da espasticidade (ou hiper-reflexia) e tem demonstrado potente efeito antinociceptivo em modelos experimentais, em doses que produzem pequeno ou nenhum bloqueio motor (SLONIMSKI; ABRAM; ZUNIGA, 2004). Considera-se inclusive que a administração intratecal do baclofen na espasticidade severa, além de aliviar a dor melhora a mobilidade (OCHS, 1993). Ainda, tem sido demonstrado seu efeito sobre o coma ou estado vegetativo persistente e existem relatos do uso desta droga também para controle da dor neuropática e distonia (TAIRA; HORI, 2003).

Entretanto, foi demonstrado um efeito antinociceptivo controverso do baclofen em modelos de dor neuropática persistente, sugerindo que seu efeito seja atenuado provavelmente devido à degeneração de interneurônios gabaérgicos após lesão de nervo periféricos (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004).

A modulação alostérica tem sido foco das pesquisas em farmacologia, uma vez que pode aumentar a seletividade da ação de uma droga. Estudos sobre possíveis moduladores alostéricos de receptor GABA_B sugerem que eles podem ter importante atividade terapêutica, já que são capazes de modificar seletivamente a função destes receptores, evitando-se assim os efeitos colaterais geralmente associados aos agonistas de receptores GABA_B (ONG; KERR, 2005).

Vale lembrar ainda, que a estimulação espinhal epidural, a qual tem sido utilizada para controle da dor, espasticidade e distonia, também envolve a participação do sistema gabaérgico (TAIRA; HORI, 2003). A estimulação elétrica da

medula espinhal causa alívio da dor neuropática devido a ativação de mecanismos gabaérgicos que inibem a liberação de aminoácidos excitatórios (CUI et al., 1997).

De forma semelhante, a analgesia induzida por agonistas de receptores nicotínicos se deve a uma estimulação do sistema colinérgico-gabaérgico (RASHID; UEDA, 2002).

Acredita-se que o melhor tratamento para a dor neuropática seja a aplicação de drogas que reduzam a excitabilidade dos neurônios, como a carbamazepina ou a gabapentina (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Nos casos de SMP, o bloqueio simpático (simpatectomia) tem sido considerado o melhor tratamento para este tipo de dor (BONICA, 1990), apesar de seu efeito ser ainda discutido (LOH; NATHAN, 1978; BARON; LEVINE; FIELDS, 1999). A simpatectomia reduz seletivamente, ou mesmo previne, as reações anormais frente a estímulos térmicos em animais com neuropatia periférica (DESMEULES et al., 1995).

Experimentalmente, a administração de agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos ou antagonistas de receptor α_1 -adrenérgicos induz antinocicepção (NAM et al., 2000).

Paralelamente, a adenosina ou seus análogos, utilizados no controle da dor neuropática em humanos ou animais, respectivamente, participam da modulação inibitória na medula, por um mecanismo que envolve aumento da liberação de NE na medula (GOMES et al., 1999).

Estudos que comparam a utilização de fármacos inibidores da recaptação de NE e serotonina (antidepressivos tricíclicos), com fármacos que inibem apenas a recaptação de serotonina, demonstram que os primeiros têm melhor eficácia no controle da dor neuropática, sugerindo um menor envolvimento da via serotoninérgica nesse processo. A diminuição da afinidade de receptores no SNC ou alterações metabólicas em fibras serotoninérgicas podem ser a causa da baixa eficiência desses fármacos (BARDIN et al., 2000).

Ainda, anestésicos locais e antagonistas de canais iônicos atuam melhor quando a dor neuropática é produzida por processo inflamatório e acomete o SNP, do que quando ela surge de lesão no SNC (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

Dados experimentais demonstram que a injeção intratecal de drogas doadoras de NO, como o S-nitroso-N-acetilpenicilaminaia, possuem efeito antinociceptivo, inibindo a alodinia mecânica induzida pela constrição dos nervos da

região lombar L5/L6 (CHEN; EISENACH; PAN, 2000). Foi demonstrado ainda que o efeito antinociceptivo da acetilcolina, em modelo dor crônica induzida por diabetes, é dependente da formação de NO espinhal (CHEN; KHAN; PAN, 2001). Em relação aos doadores de NO, outros autores demonstraram que estas drogas, dependendo da dose e do modelo de dor utilizado, têm efeito pró-nociceptivo ou antinociceptivo. Em geral, o efeito observado é antinociceptivo, porém, em altas doses observa-se uma intensificação da nocicepção (SOUSA; PRADO, 2001).

A utilização de opióides em pacientes com dor neuropática é bastante controversa (ARNER; MEYERSON, 1988). Apesar da demonstração da eficácia de agonistas de receptores μ , κ e δ no controle deste tipo de dor (KEITA; KAYSER; GUILBAUD, 1995; PRZEWLOCKA et al., 1999; MIKA; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001), muitos trabalhos mostram ausência de efeito da morfina na dor neuropática (PORTENOY, 1994; CATHELINE; LE GUEN; BESSON, 2001; ZUREK; NADESON; GOODCHILD, 2001).

Os opióides, devido ao seu mecanismo de ação, são particularmente efetivos em dores inflamatórias ou cancerosas, mas apresentam menor atividade no tratamento da dor neuropática. Estes fármacos diminuem a produção de bradicinina (prostaglandinas e leucotrienos) com conseqüente diminuição da hiperpolarização (CAVIEDES; HERRANZ, 2002).

A ineficácia do tratamento da dor neuropática pelos opióides pode ser devido à redução na sensibilidade a estes fármacos, observada nestas condições (PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este fato, entre eles, alteração no número de receptores opióides espinhais ou no sinal de transdução após a ligação do receptor opióide ao agonista (BIAN et al., 1995; ABDULLA; SMITH, 1998; PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). Estas alterações incluem redução da expressão ou destruição dos receptores opióides, mediada provavelmente pelo aumento na produção de PKC, seguida de ativação de receptores NMDA em células pós sinápticas (MAO; PRICE; MAYER, 1995a; b). Além destes mecanismos, a redução do tônus gabaérgico provavelmente contribui para a diminuição do efeito analgésico dos opióides na dor neuropática (CHEN; CHEN; PAN, 2005).

Contudo, vários trabalhos têm mostrado analgesia por opióides em alguns tipos de dor neuropática, como nevralgia pós-herpética (ROWBOTHAM; MILLIGAN;

MCHUGH, 1991; WATSON; BABUL, 1998) e dor neuropática em pacientes diabéticos (HARATI et al., 1998).

Os fármacos atualmente utilizados para o tratamento da dor crônica, em geral, provocam muitos efeitos adversos nos pacientes. De acordo com a capacidade em reverter o processo doloroso e com o tipo de efeito colateral que produzem, estes fármacos podem ser classificados em medicamentos de primeira linha (gabapentina, lidocaína tópica, analgésicos opióides, tramadol, antidepressivos tricíclicos) ou de segunda linha (outros anticonvulsivantes e antidepressivos), os quais são utilizados de forma isolada ou combinados (DWORKIN et al., 2003).

As dificuldades encontradas nos tratamentos farmacológicos são tantas, que a clínica tem recorrido a medidas terapêuticas como acupuntura ou estimulação elétrica do sistema nervoso. Porém, não se conhece o efeito dessas terapias quando empregadas por tempo prolongado (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). Diante destes fatos, ressalta-se a necessidade de maiores estudos a respeito do controle da dor neuropática, com o objetivo de encontrar fármacos mais eficazes e mais seguros para o tratamento desta modalidade de dor crônica (DWORKIN et al., 2003).

1.6 Modelos experimentais para indução de dor neuropática

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor neuropática são ainda pouco conhecidos. Em função disso, alguns modelos experimentais foram desenvolvidos na tentativa de simular o processo patológico observado em humanos. Considerando que estes modelos mimetizam razoavelmente bem as desordens dolorosas humanas, estudos que utilizam estas ferramentas e descrevem os diversos processos fisiopatológicos periféricos e centrais que ocorrem após a lesão de nervo, podem ser a base para delinear os mecanismos da dor neuropática (BACKONJA, 2003).

A dor pode ser estudada em primatas ou outros mamíferos, mas os modelos que utilizam roedores são os mais utilizados. O uso de linhagens celulares para estudo dos mecanismos da dor é uma área ainda em expansão, que têm demonstrado grande potencial em elucidar mecanismos moleculares de liberação de neurotransmissores e transdução de sinais (WANG; WANG, 2003).

Dor neuropática se refere à dor que resulta de dano ao sistema nervoso incluindo nervos, medula espinhal e regiões do SNC (WOOLF; MANNION, 1999; ZIMMERMANN, 2001). Sendo assim, os modelos envolvem a produção de doença ou lesão da medula espinhal ou nervos periféricos (WANG; WANG, 2003).

Estes modelos podem ser divididos em: 1) modelos de neuropatia periférica induzida por doença, nos quais se incluem a dor neuropática acarretada por diabetes mellitus (*diabetic neuropathic pain model* – DNP) e o modelo de neuralgia pós-herpética (*postherpetic neuralgia model* – PHN); 2) modelos de dor central, os quais consistem em lesão da medula espinhal (*spinal cord injury* – SCI), que pode ser por contusão, lesão fotoquímica ou agentes citotóxicos; 3) modelos de lesão de nervos periféricos, tais como neuroma, lesão por constrição crônica (*chronic constriction injury* – CCI), ligação parcial do nervo ciático (*partial sciatic nerve ligation* – PSL), ligação de nervos espinhais (*spinal nerve ligation* – SNL), crioneurólise do ciático (*sciatic cryoneurolysis* – SCN), ressecção do ramo caudal inferior (*inferior caudal trunk resection* – ICTR) e neurite inflamatória do ciático (*sciatic inflammatory neuritis* – SIN) (WANG; WANG, 2003).

Uma lesão parcial pode ser produzida por constrições crônicas do nervo ciático, por meio de ligações frouxas neste nervo (BENNETT; XIE, 1988). Estas constrições acarretam em edema intraneural, isquemia focal e degeneração Walleriana do axônio (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005) e geram hiperalgesia, alodinia e sinais de dor espontânea (BENNETT; XIE, 1988; ATTAL et al., 1990; TAL; BENNETT, 1994). Estes sintomas iniciam-se 1 a 5 dias após a indução da lesão, e se estendem por, pelo menos, 2 meses (BENNETT; XIE, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (BASBAUM et al., 1991; CARLTON et al., 1991).

Seltzer, Dubner e Shir (1990) propuseram um outro modelo para indução de trauma neuronal, caracterizado por uma única ligação firme do nervo ciático realizada na região proximal do nervo (PSL), que induz hiperalgesia, alodinia e dor espontânea por mais de 7 meses.

Uma variante deste modelo foi proposta por Kim e Chung (KIM; CHUNG, 1992) e compreende ligações firmes dos nervos espinhais, nos segmentos L5 e L6, próximos aos respectivos gânglios (SNL). Ainda, são descritos os modelos de transecção dos nervos tibial e sural (*tibial and sural transection* – TST) e o modelo

de transecção completa do nervo ciático (*complete sciatic transection* – CST) (LEE et al., 2000).

A presença de autotomia, hiperalgesia e alodinia são indícios comportamentais da presença de dor neuropática, observados em animais com lesão de nervos periféricos ou espinhais. A avaliação destes comportamentos é utilizada em diferentes estudos para caracterizar a presença da nocicepção (ZIMMERMANN, 2001).

Apesar de todos os modelos citados mimetizarem os sinais de dor neuropática (hiperalgesia, alodinia e dor espontânea), existem diferenças na magnitude e duração destes sinais, dependendo do modelo empregado. Inclusive, a incidência de autotomia varia entre os diferentes modelos. Na TST e na PSL os animais não apresentam autotomia severa. Já na SNL e CCI, a incidência de autotomia é baixa em comparação à CST, que apresenta o maior índice deste distúrbio (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005).

Em relação ao modelo de constrição crônica do nervo ciático, o qual foi utilizado na realização deste trabalho, estudos realizados por Dowdall, Robinson e Meert (2005) (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005), comparando cinco dos modelos acima mencionados, demonstraram que a CCI produz respostas nociceptivas mais intensas e que se mantém por mais tempo em animais submetidos a diferentes métodos de avaliação da sensibilidade dolorosa. Ainda, estes autores demonstram que a resposta nociceptiva tem início no 1º dia pós-operatório, atinge picos em momentos diferentes, dependendo do teste aplicado e torna-se consideravelmente estável a partir do 10º dia após a realização da cirurgia.

Estudos realizados por Bennet e Xie (1988) (BENNETT; XIE, 1988) demonstraram que no modelo da CCI, empregado para indução da dor neuropática, foram observados os sinais de hiperalgesia e alodinia a partir do 1º dia pós-cirúrgico até por pelo menos 75 dias. Estes resultados foram confirmados em nosso laboratório durante a padronização deste modelo experimental de dor crônica, onde também foi detectado o parâmetro de dor espontânea no mesmo período de observação da hiperalgesia e alodinia (GUTIERREZ, 2005).

A utilização de modelos experimentais para indução da dor neuropática tem proporcionado não apenas a compreensão dos mecanismos envolvidos nesta modalidade de dor, como também o estudo de novas substâncias com potencial terapêutico para o tratamento de algias crônicas provenientes de lesão de nervos.

Neste sentido, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo têm focado na avaliação do efeito antinociceptivo de um peptídeo sintético idêntico a região C-terminal da proteína ligante de cálcio S100A9 murina sobre os sinais característicos da dor neuropática experimental, quais sejam, a hiperalgesia, a alodinia e a dor espontânea, provenientes da constrição crônica do nervo ciático (PACCOLA et al., 2007).

1.7 Proteína S100A9

A proteína ligante de cálcio MRP-14 (S100A9), juntamente com outra proteína denominada MRP-8 (S100A8), foram isoladas, seqüenciadas e clonadas de culturas de células de onde se tentava caracterizar o MIF - *Migration Inhibitory Factor* (ODINK et al., 1987). A denominação de MRP refere-se a *MIF Related Proteins* e 8 ou 14 para designar seus pesos moleculares (ODINK et al., 1987; HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993). Posteriormente, estas proteínas foram denominadas de *Myeloid Related Proteins*, uma vez que são expressas por células de linhagem mielomonocíticas (RAMMES et al., 1997).

Uma vez que estas proteínas pertencem à família das proteínas S100, foi proposto por Schafer et al (SCHAFFER et al., 1995) uma nova nomenclatura relacionada com os genes que codificam as proteínas desta família, baseado no arranjo físico do cromossomo 1q21. De acordo com esta nomenclatura, as proteínas MRP-8 e MRP-14 são classificadas como S100A8 e S100A9, respectivamente (NACKEN et al., 2003). As proteínas da família S100 são proteínas acídicas de baixo peso molecular (10-12 kDa), solúveis em 100% de sulfato de amônia (ZIMMER et al., 1995). A função das proteínas desta família é tecido-específica e está relacionada com a regulação homeostática de cálcio intracelular (STRIZ; TREBICHAUSKY, 2004).

As subunidades de 10,8 kDa (S100A8) e 13,2 kDa (S100A9) também foram denominadas, respectivamente, de p8 e p14 (HOGG; ALLEN; EDGEWORTH, 1989), cadeia leve e pesada da L1 (ANDERSSON et al., 1988) e calgranulina A e B (KELLY; JONES; FLEMING, 1989).

No que se refere à estrutura protéica, foi demonstrado que ambas as proteínas possuem sítios de ligação para cálcio e zinco e que as duas subunidades podem ser encontradas na forma de um complexo denominado calprotectina, sendo que a porção C-terminal da S100A9 é crítica para a formação deste complexo (PROPPER et al., 1999).

As proteínas S100A8 e A9 murinas e humanas possuem cerca de 60% de homologia entre si (HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993) e a similaridade entre a S100A9 murina e humana, com relação à localização celular, padrão de expressão, presença de isoformas, capacidade de interagir com a S100A8 e sua secreção durante estimulação e diferenciação celular sugerem uma funcionalidade equivalente entre ambas (NACKEN et al., 2000).

A expressão destas proteínas está associada a neutrófilos e monócitos circulantes (ZWADLO et al., 1988) e, em situações específicas, a queratinócitos (KERKHOFF; KLEMP; SORG, 1998). Foi também demonstrada a expressão da S100A8 por células de linhagem endotelial, sob estimulação com lipopolissacarídeo – LPS ou interleucina (IL)-1 (YEN et al., 1997). Macrófagos recém migrados expressam S100A8 e A9 durante curto período de tempo, enquanto macrófagos residentes não as expressam, o que sugere a perda destas proteínas durante a diferenciação de monócito em macrófago (ZWADLO et al., 1988; HOGG; ALLEN; EDGEWORTH, 1989). Ainda, S100A8 e A9 não são detectadas em linfócitos, plaquetas, basófilos e eosinófilos (HOGG; ALLEN; EDGEWORTH, 1989).

Os neutrófilos e os monócitos possuem em seu citoplasma altas concentrações das proteínas S100A8 e A9, chegando a proporções de 30-60% das proteínas totais para os neutrófilos e 1% para monócitos (EDGEWORTH; FREEMONT; HOGG, 1989; HESSIAN; EDGEWORTH; HOGG, 1993; STRIZ; TREBICHAUSKY, 2004).

Altos níveis de calprotectina foram detectados no soro de pacientes com artrite reumatóide, bronquite crônica e fibrose cística, sugerindo que estas proteínas são secretadas em diferentes condições patológicas (KERKHOFF; KLEMP; SORG, 1998). A presença de altas concentrações do complexo no soro, plasma, fluido sinovial, fezes e urina de pacientes portadores de diversas alterações patológicas, levaram à utilização da calprotectina como biomarcador laboratorial de processos inflamatórios, especialmente no diagnóstico de doenças inflamatórias não

infecciosas, uma vez que ela é mais sensível na indicação de ativação de fagócitos do que outros exames (STRIZ; TREBICHAUSKY, 2004).

As proteínas S100A8 e A9 têm sido predominantemente descritas como proteínas citoplasmáticas (EDGEWORTH; FREEMONT; HOGG, 1989; LAGASSE; WEISSMAN, 1992), porém foi demonstrado que na vigência de inflamação e/ou após mobilização de cálcio essas proteínas são translocadas do citosol para componentes do citoesqueleto e para a membrana citoplasmática (ROTH et al., 1993; VAN DEN BOS et al., 1996).

Dentre os efeitos biológicos das proteínas S100A8 e A9 foi demonstrado que o complexo possui atividade microbicida quando testado *in vitro* sobre diferentes microorganismos (STEINBAKK et al., 1990), inibe o crescimento de células da medula e macrófagos, além de ser fator regulador negativo para o crescimento de células tumorais (YUI; MIKAMI; YAMAZAKI, 1995b). Em adição, este complexo protéico induz apoptose de alguns tipos de células tumorais e este efeito é inibido pela presença de zinco (YUI; MIKAMI; YAMAZAKI, 1995a).

Com relação à resposta inflamatória, foi demonstrado um efeito regulatório da calprotectina em modelo de artrite induzida pelo adjuvante avidrina em ratos (BRUN et al., 1995). Sugere-se ainda que a calprotectina, extracelularmente, influencia o processo inflamatório pela modulação do crescimento e pelo estado de sobrevivência de fibroblastos normais, sendo esses efeitos controlados fisiologicamente por íons metálicos (YUI et al., 1997).

Estudos realizados especificamente com a S100A9 demonstraram que esta proteína age seletivamente na exsudação leucocitária, por estimular a adesão dos neutrófilos ao endotélio via receptor Mac-1 $\beta 2$ integrina (NEWTON; HOGG, 1998) e aumento da expressão de moléculas de adesão CD11b e ICAM-1 (EUE et al., 2000). Foi também demonstrado, *in vitro*, que neutrófilos deficientes de S100A9 apresentam uma redução na resposta à estímulos quimiotáticos, pela diminuição da expressão de CD11b após estimulação com IL-8, além de distúrbios no balanço de actina-F/G e diminuição da migração induzida por leucotrieno B₄ – LTB₄ (MANITZ et al., 2003).

A S100A9 isolada está presente em altas concentrações em exsudato inflamatório induzido por carragenina em ratos e estimula a proliferação de fibroblastos (SHIBATA et al., 2004). Além de uma ação seletiva desta proteína sobre a exsudação leucocitária, foi demonstrado que a S100A9, mas não a S100A8, é

capaz de desativar macrófagos peritoneais ativados obtidos de camundongos inoculados com Onco BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), além de inibir o "burst" respiratório dessas células (AGUIAR-PASSETI et al., 1997).

Em complementação aos efeitos da S100A9 sobre alguns parâmetros do processo inflamatório, estudos realizados pelo nosso grupo demonstrou que esta proteína possui potente atividade antinociceptiva quando avaliada em modelo de dor inflamatória, caracterizado pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (GIORGI et al., 1998). Foi também demonstrado que a S100A9, secretada por neutrófilos, medeia a inibição da resposta dolorosa em modelos de peritonite neutrofílica induzida por glicogênio, carragenina ou zimosan (GIORGI et al., 1998; PAGANO, 2001; PAGANO et al., 2002; PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006).

Com base nas observações sobre o efeito antinociceptivo da proteína S100A9, posteriormente foi sintetizado um peptídeo homólogo à região C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m), considerando-se a seqüência de aminoácidos descrita por Raftery et al. (1996) (RAFTERY et al., 1996). O peptídeo, composto por 19 aminoácidos, que corresponde às posições H⁹²-G¹¹⁰ da região C-terminal desta proteína, possui uma região rica em histidina referida como sítio ligante de zinco (RAFTERY et al., 1996) e alta homologia com o domínio 5 do cininogênio de alto peso molecular humano (HESSIAN; WILKINSON; HOGG, 1995). Foi demonstrado que a região que contém os resíduos de histidina (His¹⁰³-His¹⁰⁵), presentes na região C-terminal da proteína S100A9, representa um sítio ligante de ácido araquidônico (SOPALLA et al., 2002). Em adição, Freemont, Hogg e Edgeworth (FREEMONT; HOGG; EDGEWORTH, 1989) constataram que esta região da S100A9 humana é idêntica ao N-terminal do NIF (*Neutrophil-immobilizing-factor*), o qual inibe a migração e quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos humano (WATT; BRIGHTMAN; GOETZL, 1983).

Assim, este peptídeo vem sendo estudado pelo nosso grupo em diferentes modelos de dor inflamatória. Estes estudos demonstraram que, como o observado com a proteína intacta, o peptídeo C-terminal da S100A9 murina também possui efeito antinociceptivo em animais submetidos a modelos distintos de avaliação da sensibilidade dolorosa, tais como o modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, o modelo de hiperalgesia mecânica e térmica durante a inflamação induzida pela carragenina em ratos avaliados pelo teste de pressão de pata e da placa quente, respectivamente (DALE et al., 2006b).

Contudo, o C-terminal da S100A9 murina não demonstrou efeito antinociceptivo quando a nocicepção não foi desencadeada por reação inflamatória (DALE et al., 2006b). Foi ainda demonstrado que o pS100A9m inibe a hiperalgesia inflamatória induzida por proteases de diferentes famílias (DALE, 2002; DALE et al., 2004). Recentemente, foi observado que este peptídeo inibe não apenas a hiperalgesia induzida pela tripsina, uma serinoprotease capaz de ativar receptores ativados por protease do tipo 2 (*proteinase-activated receptor-2* - PAR₂), bem como àquela acarretada pelo peptídeo agonista de PAR₂ (DALE et al., 2006a).

Além dos efeitos do pS100A9m observados sobre modelos distintos de dor inflamatória, estudos realizados *in vitro* demonstraram que este peptídeo inibe a fagocitose por células peritoneais aderentes (PAGANO et al., 2005).

Os resultados obtidos pelo nosso grupo que demonstram atividade antinociceptiva tanto da proteína S100A9 quanto do C-terminal da S100A9 murina, sobre a dor inflamatória aguda, despertaram o interesse em avaliar o efeito deste peptídeo sobre a dor neuropática experimental.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Uma vez que o peptídeo sintético homólogo à região C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) reverte a hiperalgesia inflamatória aguda, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do pS100A9m sobre a dor neuropática experimental e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção acarretada por esse peptídeo no modelo de dor crônica induzido pela constrição do nervo ciático. Para tanto, foi investigada a participação de receptores opióides, serotoninérgicos, gabaérgicos e α_2 -adrenérgicos na antinocicepção induzida pelo pS100A9m. Foi também avaliado o efeito do peptídeo C-terminal da S100A9 murina sobre a ativação dos proto-oncogenes Egr-1 e c-Fos, bem como a expressão da citocina inflamatória $\text{TNF}\alpha$, na medula espinhal lombar de ratos submetidos à constrição do nervo ciático.

Material e

métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 180 e 200g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em local apropriado, com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro (12/12 horas), com livre acesso à água e ração por um período mínimo de três dias antes dos experimentos. Os testes comportamentais foram realizados entre 9 horas e 16 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo nº 206/05 aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

3.2 Síntese e utilização do peptídeo homólogo à porção C-terminal da proteína ligante de cálcio S100A9 murina - pS100A9m

O peptídeo empregado nos ensaios, com seqüência idêntica à região C-terminal da proteína S100A9 murina contendo 19 aminoácidos, situados entre as posições 92-110 (H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G), foi sintetizado em fase sólida pela técnica Fmoc. A caracterização e purificação deste peptídeo foram realizadas por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e a massa determinada por espectroscopia do tipo MALDI-TOF. O peptídeo C-terminal da S100A9 murina (pS100A9m) foi sintetizado no Departamento de Biofísica do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal Paulista (UNIFESP). O pS100A9m foi diluído em uma solução de HCl 0,01M (ácido clorídrico 0,01M) na concentração final de 1 mg/ml. No momento do uso, o peptídeo foi novamente diluído em salina estéril e administrado nas doses de 1, 4 ou 8µg/animal pelas vias intraplantar (i.pl.) ou oral (p.o.) ou nas doses de 0,1; 0,5 ou 1µg/animal pela via intratecal (i.t.). Os testes foram realizados 1 hora após a administração do pS100A9m, com exceção dos experimentos para avaliação da duração do efeito, em que os testes nociceptivos

foram realizados em diferentes tempos após os tratamentos com o peptídeo. Animais tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) foram submetidos aos mesmos protocolos e avaliados como controles.

3.3 Planejamento Geral

Ratos anestesiados com halotano e submetidos à cirurgia para constrição do nervo ciático foram avaliados segundo os seguintes protocolos experimentais:

- ✓ Realização dos testes de pressão de pata e de estimulação tátil, antes da cirurgia para constrição do nervo ciático e no 14º dia pós-cirúrgico, antes e 1 hora após a administração do pS100A9m pelas vias i.pl., p.o. ou i.t.;
- ✓ No 14º dia pós-cirúrgico, realização do teste para determinação da presença de dor espontânea, 1 hora após a administração do pS100A9m pelas vias i.pl., p.o. ou i.t.;
- ✓ Realização dos testes de pressão de pata e estimulação tátil antes da CCI e 14 dias após a cirurgia, antes do tratamento com o peptídeo pelas vias i.pl., p.o. ou i.t. e em diferentes tempos após estes tratamentos;
- ✓ Teste de pressão de pata e estimulação tátil antes da cirurgia e no 14º dia pós-operatório, antes e 1 hora após a administração via i.pl. do pS100A9m na pata contralateral a CCI;
- ✓ Teste de pressão de pata antes da cirurgia e no 7º dia pós-operatório, antes e 1 hora após a administração do pS100A9m pela via i.pl.;
- ✓ Realização dos testes de pressão de pata e estimulação tátil antes da cirurgia e no 14º dia pós-operatório, antes e 1 hora após o tratamento dos animais com o pS100A9m, pela via i.pl., em associação com os antagonistas de receptores opióides, serotoninérgicos, gabaérgicos ou α_2 -adrenérgicos;
- ✓ Teste de pressão de pata e de estimulação tátil antes da cirurgia e no 7º ou 14º dia pós-operatório, a fim de confirmar o desenvolvimento da resposta nociceptiva dos animais. O pS100A9m foi administrado pela via i.pl. e após 1 hora, sob anestesia, foi realizada a perfusão transcardíaca com paraformaldeído 4% e a coleta de fragmentos de medula espinal lombar para imuno-marcação das proteínas Egr-1, Fos e TNF α .

3.4 Produção da dor neuropática

Para a indução de dor neuropática, os animais foram anestesiados com halotano e a constrição do nervo ciático (*chronic constriction injury* - CCI) foi realizada de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988) modificado. O nervo foi exposto na região mediana da coxa e, próximo à sua trifurcação, foram realizadas 4 ligaduras frouxas, distantes entre si em aproximadamente 1mm, utilizando-se o fio absorvível catgut cromado (4-0). A incisão foi suturada em camadas utilizando-se fio de sutura de seda (4-0). Estes animais constituem o grupo experimental operado (Op). Como controle, animais falso-operados (F.Op.) tiveram o nervo ciático exposto, porém não foi realizada nenhuma ligadura ou lesão.

3.5 Avaliação da nocicepção

3.5.1 Hiperalgisia - Teste de pressão da pata

Para avaliação da hiperalgisia mecânica, foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e 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 e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação.

A avaliação da resposta hiperalgésica foi realizada segundo os protocolos descritos anteriormente e os resultados foram analisados pela comparação das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, pela comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais. Para reduzir o estresse, os animais foram habituados ao teste no dia anterior ao experimento.

Figura 1 – Teste de pressão de pata

3.5.2 Alodinia – Teste de estimulação tátil

A alodinia mecânica foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado à pata posterior do rato empregando-se os filamentos de von Frey (Semmes–Weinstein monofilaments - von Frey hairs; Stoelting, Wood Dale, IL, USA), de acordo com Chaplan et al., 1994 (CHAPLAN et al., 1994), adaptado por Milligan et al., 2000 e Chacur et al., 2001 (MILLIGAN et al., 2000; CHACUR et al., 2001). Este teste foi utilizado para avaliar a sensibilidade mecânica de baixo limiar antes e depois da CCI. Os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas dos mesmos. Os animais foram, inicialmente, habituados por 30 minutos durante os 2 dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados nas gaiolas 5 minutos antes do início de cada medida. Para o ensaio de alodinia, foi utilizada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey, cuja calibração é definida como $\log_{10} (\text{mg} \times 10)$, tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407g); 3,84 (0,692g); 4,08 (1,202g); 4,17 (1,479g); 4,31 (2,041g); 4,56 (3,630g); 4,74 (5,495g); 4,93 (8,511g); 5,07 (11,749g) e 5,18 (15,136g). Os filamentos foram aplicados sob a área plantar da pata posterior direita,

um a um, perpendicularmente, e mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041g. Na ocorrência da retirada da pata a este filamento foi utilizado o filamento de menor calibre. Na ausência de resposta, a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até se obter uma resposta. O filamento que induziu a retirada da pata do animal foi aplicado novamente após 30 a 60 segundos. O filamento capaz de induzir duas respostas consecutivas foi considerado como a rigidez necessária para induzir a resposta de retirada da pata. A avaliação da alodinia foi realizada de acordo com os protocolos descritos anteriormente.

O limiar de rigidez (em log) necessário para induzir a resposta foi estimado pela aplicação de uma função psicométrica integral Gaussiana. A função Gaussiana foi aplicada utilizando programa de computador *PsychoFit* (MILLIGAN et al., 2000). Os valores obtidos foram utilizados para análise estatística paramétrica pela comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, pela comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 2 – Teste de estimulação tátil

3.5.3 Dor espontânea

Para a determinação da dor espontânea, os ratos foram observados quanto à manifestação de comportamentos relacionados a este parâmetro, caracterizados pela lambida e levantamento (“posição de guarda”) da pata referente ao membro submetido a CCI, no 14º dia após a cirurgia 1h após o tratamento com o pS100A9m. Para a observação destes sinais, os animais foram colocados, um a um, em caixa de plástico transparente à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Após o período de habituação de 30 minutos, os ratos foram observados durante 10 minutos, determinando-se a duração do tempo (em segundos) de lambida e de levantamento da pata. As atividades realizadas como parte do comportamento normal de “grooming” dos animais, não foram consideradas.

Figura 3 – Teste de dor espontânea

3.6 Procedimento para tratamento intratecal

Os animais foram anestesiados com halotano e após o arqueamento da coluna vertebral foi realizada a punção lombar, de acordo com descrições de literatura (GRISEL; WATKINS; MAIER, 1996; CHACUR et al., 2004). Uma agulha

estéril foi inserida entre as vértebras lombares L5 e L6. Imediatamente após a inserção foi observado o *flick* característico, indicando a entrada da agulha no espaço subaracnóideo da medula. Nos tratamentos pela via intratecal o volume final injetado foi de 50µl.

3.7 Tratamentos farmacológicos

Ratos submetidos à constrição do nervo ciático e avaliados quanto à presença de hiperalgesia e alodinia, após 14 dias do procedimento cirúrgico, foram tratados com o peptídeo C-terminal da S100A9, sempre pela via i.pl. na dose de 8µg/animal conjuntamente com diferentes tipos de antagonistas, segundo os protocolos abaixo descritos:

- **Naloxona** (Cloridrato de Naloxona – Rhodia do Brasil): antagonista não seletivo de receptores opióides. No primeiro protocolo, a naloxona foi dissolvida em salina estéril (1µg/50µL), injetada via i.pl. imediatamente após o pS100A9m e a hiperalgesia e alodinia avaliadas 1 hora após os tratamentos. No segundo protocolo, a naloxona, dissolvida da mesma maneira, foi injetada via i.pl. 45 minutos após o pS100A9m e os testes comportamentais realizados após 15 minutos do último tratamento.
- **Metisergida** (*Methysergide maleate* – Sigma-Aldrich): antagonista não seletivo de receptores de serotonina. A metisergida (5mg/kg) foi dissolvida em salina estéril, administrada por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes do pS100A9m. Após 1 hora do último tratamento os animais foram avaliados quanto a hiperalgesia e a alodinia.
- **Ioimbina** (*Yohimbine hydrochloride* – Tocris Cookson Ltd.): antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos. A ioimbina (1mg/kg) foi dissolvida em água destilada estéril, administrada por via endovenosa (e.v.) imediatamente antes do pS100A9m e os testes comportamentais aplicados após 1 hora do tratamento com o peptídeo.
- **Bicuculina** ((-)-*Bicuculline methiodide* – Tocris Cookson Ltd.): antagonista de receptores GABA_A. A bicuculina (0,5mg/kg) foi dissolvida em salina estéril, administrada por via i.p. 15 minutos antes do pS100A9m. Após 1 hora do

último tratamento os animais foram avaliados pelos testes de pressão de pata e estimulação tátil.

- **Saclofen** (*2-Hydroxysaclofen* – Tocris Cookson Ltd.): antagonista de receptores GABA_B. O saclofen (30µg/animal) foi dissolvido em salina estéril, administrado por via i.t. 10 minutos antes do pS100A9m e os testes comportamentais aplicados após 1 hora do tratamento com o peptídeo.

Em todos os protocolos, animais tratados com veículo do antagonista e pS100A9m ou com antagonista e veículo do peptídeo, ou ainda com veículo do antagonista e veículo do peptídeo foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais e avaliados como controles.

3.8 Imuno-histoquímica

A fim de se determinar a expressão das proteínas Egr-1, Fos e TNF α na medula espinhal de ratos submetidos à constrição do nervo ciático e tratados com o pS100A9m, sempre pela via i.pl. na dose de 8µg/animal, foi realizada a marcação para essas proteínas empregando-se a técnica de imuno-histoquímica. A análise foi realizada na medula de animais perfundidos 1 hora após o tratamento com o peptídeo.

Para a realização destes experimentos os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 1) Animais que não foram submetidos a qualquer intervenção cirúrgica (brancos);
- 2) Animais falso-operados no 7º ou 14º dia pós-cirúrgico;
- 3) Animais operados no 7º ou 14º dia após a CCI;
- 4) Animais operados e tratados com pS100A9m no 7º ou 14º dia após a CCI.
- 5) Animais operados e tratados com veículo no 7º ou 14º dia após a CCI.

Os animais dos grupos descritos acima foram anestesiados com uma associação de quetamina e xilazina (1:1 – 100µl/100g i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina (1ml/g), seguida de solução fixadora (1-2ml/g) constituída de 4% de paraformaldeído (PFA 4%) dissolvido em tampão fosfato

(phosphate buffer - PB) 0,1M (pH 7,4) – PFA 4%. Após a perfusão, fragmentos de medula espinal lombar foram coletados e pós-fixados em PFA 4% a 4° C por 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB a 4° C por 48 horas no mínimo.

Posteriormente, os tecidos foram emblocados em "tissue freezing medium" (TBS[®]), cortados em criostato (-26°C), a uma espessura de 14µm e os cortes coletados em lâminas gelatinizadas. Em seguida, as lâminas foram mantidas em placa aquecida a 37°C por 15 minutos e posteriormente armazenadas em freezer à -20°C.

Para a identificação da expressão das proteínas Egr-1, Fos e TNF α na medula dos ratos, foram utilizados os anticorpos primários contra as proteínas Egr-1 (Santa Cruz), c-Fos (Calbiochem) e TNF α (Chemicon), obtidos em coelho.

Para tanto, as lâminas foram descongeladas em placa aquecida por 10 minutos e depois foram lavadas em PB 0,1M (3 vezes por 10 minutos). Os tecidos foram incubados durante 12-18 horas à temperatura ambiente com o anticorpo primário específico contra Egr-1 (1:1000), Fos (1:2000) ou TNF α (1:1000), diluído em PBT (0,3% de Triton X-100 em PB na proporção de 1:9 e 5% de soro normal de cabra ou burro). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PB 0,1M (3 vezes por 10 minutos) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário biotinilado anti-coelho obtido em cabra ou burro (1:200). Novamente as lâminas foram lavadas e, posteriormente, incubadas com complexo avidina-biotina (ABC Elite, Vector Labs), na diluição 1:100, durante 2 horas. Após lavar novamente as lâminas em PB 0,1M, foi realizada a reação com 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma-Aldrich) e solução 0,01% de peróxido de hidrogênio em PB. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas e a marcação dos cortes intensificadas por tetróxido de ósmio. Em seguida, os cortes foram desidratados em bateria de concentrações crescentes de álcool e xilol, sendo então cobertos com lamínulas utilizando-se *Permount* (Fischer[®]).

Os cortes histológicos submetidos à imuno-marcação foram analisados por microscópio convencional de luz (Leica, DL LS Alemanha) e as quantificações realizadas por análise de imagens auxiliada por computador, utilizando-se o programa *Image* (NIH, USA). Para cada anticorpo, foram imuno-marcadas de 1 a 3 lâminas por animal de cada um dos grupos e foram quantificados de 5 a 10 cortes

por lâmina. Foi então obtida a média de marcação (nº de núcleos ou células/área) para cada animal e, a partir das médias individuais, foram calculadas as médias para cada grupo experimental.

Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente por Análise de Variância - ANOVA associada ao teste de Tukey. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$ calculado com software GraphPad InStat tm/GraphPad Software V2.01 – Copyright ©, 1990-1993. Nos ensaios de imuno-histoquímica, os resultados foram analisados comparando-se as médias obtidas nos lados direito e esquerdo da medula espinhal lombar para cada grupo experimental, empregando-se o teste *t* de Student unicaudal do tipo pareado, sendo considerado o índice de significância $p < 0,05$ (SNEDECOR; SOKAL; ROHLF, 1946; SNEDECOR; COCHRAN, 1974).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a hiperalgesia induzida pela CCI

A fim de verificar a capacidade do pS100A9m em interferir com a hiperalgesia presente na dor neuropática experimental, ratos submetidos à constrição do nervo ciático foram avaliados no teste de pressão de pata para determinação da presença de hiperalgesia 14 dias após a CCI. Uma vez presente a hiperalgesia, os animais foram tratados com o peptídeo C-terminal da S100A9 nas doses de 1, 4 ou 8 µg/animal pelas vias intraplantar ou oral e nas doses de 0,1; 0,5 ou 1 µg/animal pela via intratecal. O teste de pressão de pata foi aplicado novamente 1 hora após o tratamento com o peptídeo.

O pS100A9m por via i.pl. nas doses de 1 ou 4 µg/pata não interferiu com a hiperalgesia dos animais. Já, a dose de 8 µg/pata do peptídeo reverteu totalmente a hiperalgesia observada no 14º dia após o procedimento cirúrgico (figura 4A).

De maneira idêntica, o pS100A9m p.o., nas doses de 1 ou 4 µg/animal não alterou a resposta hiperalgésica dos animais observada após a instalação da dor neuropática. Já, a administração do peptídeo p.o. na dose de 8 µg/animal reverteu completamente a hiperalgesia 14 dias após a CCI (figura 5A).

Quando administrado pela via i.t., o pS100A9m na dose de 0,1 µg/animal, não interferiu com a hiperalgesia apresentada pelos animais, enquanto que as doses de 0,5 ou 1 µg/animal reverteram a hiperalgesia decorrente da lesão do nervo ciático após 14 dias (figura 6A).

Animais tratados com o veículo do peptídeo (salina + HCl 0,01M) foram avaliados como controle e continuaram apresentando hiperalgesia 1 hora após os tratamentos, demonstrando que o veículo, por si só, não interfere com a nocicepção dos animais.

Ainda como controle, ratos falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e não demonstraram alteração do limiar nociceptivo, quando comparados com os valores obtidos antes da CCI (figuras 4B, 5B e 6B),

demonstrando que o procedimento cirúrgico, sem a lesão do nervo ciático, não altera o limiar nociceptivo dos ratos.

Figura 4 - Efeito da administração do pS100A9m i.pl. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de pressão de pata antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 1, 4 ou 8µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 5 - Efeito da administração do pS100A9m p.o. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de pressão de pata antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 1, 4 ou 8µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 a 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 6 - Efeito da administração do pS100A9m i.t. sobre a hiperalgesia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de pressão de pata antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 0,1; 0,5 ou 1µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.2 Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a alodinia decorrente da CCI

Para avaliar a capacidade do pS100A9m em alterar o limiar tátil de animais com dor neuropática experimental, ratos submetidos à constrição do nervo ciático foram avaliados pelo teste de estimulação tátil, empregado para se determinar a presença de alodinia 14 dias após a CCI. Uma vez observada a presença de alodinia, os animais foram tratados com o peptídeo C-terminal da S100A9 nas doses de 1, 4 ou 8 µg/animal pelas vias intraplantar ou oral e nas doses de 0,1; 0,5 ou 1 µg/animal pela via intratecal. O teste de estimulação tátil foi aplicado novamente 1 hora após o tratamento com o peptídeo.

Quando o peptídeo foi administrado pela via i.pl. nas doses de 1 ou 4 µg/pata não interferiu com a alodinia dos animais, enquanto que a dose de 8 µg/pata do pS100A9m reverteu totalmente a alodinia observada no 14º dia após o procedimento cirúrgico (figura 7A).

Da mesma forma, o pS100A9m p.o., nas doses de 1 ou 4 µg/animal, não alterou a sensibilidade tátil dos animais observada após a instalação da dor neuropática. Já, a administração do peptídeo p.o. na dose de 8 µg/animal reverteu completamente a alodinia 14 dias após a CCI (figura 8A).

O pS100A9m por via i.t., na dose de 0,1 µg/animal, não interferiu com a alodinia apresentada pelos animais. Já, as doses de 0,5 ou 1 µg/animal reverteram a alodinia decorrente da lesão do nervo ciático após 14 dias (figura 9A).

Assim como observado no teste de pressão de pata, ratos tratados com o veículo do peptídeo (salina + HCl 0,01M) e avaliados como controles continuaram apresentando alodinia 1 hora após os tratamentos. Ainda, animais falso-operados submetidos ao mesmo protocolo experimental não demonstraram alteração do limiar tátil, quando comparados com os valores obtidos antes da CCI (figuras 7B, 8B e 9B).

Figura 7 - Efeito da administração do pS100A9m i.pl. sobre a alodinia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de estimulação tátil antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 1, 4 ou 8µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 8 - Efeito da administração do pS100A9m p.o. sobre a alodinia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de estimulação tátil antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 1, 4 ou 8µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 a 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 9 - Efeito da administração do pS100A9m i.t. sobre a alodinia induzida pela CCI. Os animais foram submetidos ao teste de estimulação tátil antes da CCI e 14 dias depois, antes do tratamento e 1 hora depois do tratamento com o peptídeo nas doses de 0,1; 0,5 ou 1µg/animal (A). Animais falso-operados foram tratados com o pS100A9m pela mesma via e nas mesmas doses e avaliados como controles (B). Animais submetidos aos mesmos protocolos foram tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) e também avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.3 Caracterização do efeito do pS100A9m, administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal, sobre a dor espontânea observada após a CCI

Com o objetivo de investigar a capacidade do pS100A9m em interferir com a dor espontânea induzida pela CCI, ratos submetidos à constrição do nervo ciático foram tratados com o pS100A9m e avaliados quanto à presença de dor espontânea, 14 dias após o procedimento cirúrgico, 1 hora após a administração do peptídeo. Uma vez que foram testadas doses diferentes para cada via de administração, frente a hiperalgesia e alodinia decorrentes da CCI, apenas as doses que reverteram estes fenômenos foram utilizadas para avaliar o efeito sobre a dor espontânea. Portanto, utilizou-se a dose de 8µg/animal pelas vias intraplantar ou oral e a dose de 0,5µg/animal pela via intratecal.

A dor espontânea foi determinada pela presença dos comportamentos de lambar ou levantar a pata, sinais da presença de dor espontânea induzida pela CCI, referente ao membro submetido à cirurgia e estes comportamentos foram medidos com relação aos respectivos tempos de duração.

O pS100A9m administrado pela via intraplantar (figura 10A), oral (figura 10B) ou intratecal (figura 10C) inibiu totalmente o comportamento de lambida de pata e reduziu significativamente o levantamento da pata dos animais.

Ratos tratados com o veículo do peptídeo (salina + HCl 0,01M) foram avaliados como controle e continuaram apresentando sinais de dor espontânea 1 hora após os tratamentos. Sendo assim, o veículo por si só, além de não interferir com a hiperalgesia e com a alodinia, também não interfere com a dor espontânea decorrente da lesão nervosa.

Animais falso-operados não apresentam os sinais de dor espontânea (dados não mostrados).

Figura 10 - Efeito da administração do pS100A9m por via i.pl. (A), p.o. (B) ou i.t. (C) sobre a dor espontânea induzida pela CCI. Os animais foram tratados com o peptídeo na dose de 8µg/animal i.pl. ou p.o. ou na dose de 0,5µg/animal i.t. e após 1 hora foram submetidos ao teste nociceptivo. Animais tratados com veículo (salina+HCl 0,01M) foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais e avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos com o grupo controle ($p < 0,0001$).

4.4 Determinação do tempo de duração do efeito antinociceptivo do pS100A9m injetado pelas vias i.pl., p.o. ou i.t. sobre a hiperalgesia e a alodinia observadas 14 dias após a CCI

Sabendo-se que o pS100A9m administrado pela vias intraplantar ou oral na dose de 8µg/animal, ou intratecal na dose de 0,5µg/animal, reverte a hiperalgesia e alodinia observadas no 14º dia após a cirurgia para indução de dor neuropática, foi avaliada a duração do efeito do peptídeo nestas vias e doses. Os testes de pressão de pata e estimulação tátil foram aplicados antes e após 14 dias do procedimento cirúrgico em diferentes tempos após o tratamento com o peptídeo. Animais tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) foram utilizados como controles.

Como observado anteriormente, o pS100A9m (8µg/animal) por via i.pl. reverte tanto a hiperalgesia (figuras 11A) quanto a alodinia (figura 12A) 1 hora após a sua administração. Este efeito também foi observado quando a hiperalgesia foi avaliada 3 e 5 horas após a administração do peptídeo, não sendo mais detectado na sexta hora após o tratamento (figura 11A). Por outro lado, o peptídeo via i.pl. foi capaz de reverter a alodinia só até a terceira hora após sua administração (figura 12A). Assim, o pS100A9m quando injetado pela via intraplantar induz um efeito anti-hiperalgésico até 5 horas após sua administração e uma ação anti-alodínica por até 3 horas (figuras 11A e 12A).

A avaliação da duração do efeito do peptídeo (8µg/animal) administrado p.o., sobre os fenômenos algogênicos provenientes da dor neuropática 14 dias após a CCI, demonstrou que o pS100A9m reverte a hiperalgesia (figura 11B) até a 5ª hora após sua administração e a alodinia (figura 12B) apenas na primeira hora após o tratamento.

Quando a hiperalgesia (figura 11C) e a alodinia (figura 12C) foram avaliadas 1 hora após a administração intratecal do peptídeo (0,5µg/animal), observou-se uma reversão total desses fenômenos, como já tinha sido demonstrado anteriormente. Contudo, este efeito não foi mais observado quando os animais foram avaliados 3 horas após o tratamento, demonstrando que o peptídeo administrado centralmente, nesta dose, possui efeito de curta duração no modelo da CCI.

Os animais controles (tratados com veículo) submetidos aos mesmos protocolos experimentais não apresentaram inibição dos fenômenos nociceptivos em todos os tempos avaliados (figuras 11A, B, C e 12A, B, C).

Figura 11 – Duração do efeito da administração intraplantar (A), oral (B) ou intratecal (C) do pS100A9m sobre a hiperalgesia de ratos submetidos à CCI. Os animais foram avaliados no teste de pressão de pata antes da CCI e, após 14 dias, antes dos tratamentos e em diferentes tempos depois dos mesmos. Os ratos foram tratados com pS100A9m nas doses 8 μ g/animal i.pl. ou p.o. ou 0,5 μ g/animal i.t. Animais tratados com o veículo (salina+HCl 0,01M) nas mesmas condições foram utilizados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 12 – Duração do efeito da administração intraplantar (A), oral (B) ou intratecal (C) do pS100A9m sobre a alodinia de ratos submetidos à CCI. Os animais foram avaliados no teste de estimulação tátil antes da CCI e, após 14 dias, antes dos tratamentos e em diferentes tempos depois dos mesmos. Os ratos foram tratados com pS100A9m nas doses de 8 μ g/animal i.pl. ou p.o. ou 0,5 μ g/animal i.t. Animais tratados com o veículo (salina+HCl 0,01M) nas mesmas condições foram utilizados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 8 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.5 Efeito do pS100A9m injetado pela via i.pl. na pata contralateral à CCI 14 dias após a cirurgia

Uma vez demonstrado o efeito antinociceptivo do peptídeo C-terminal da S100A9 murina, administrado por três vias distintas, sobre a dor neuropática experimental, decidiu-se avaliar se a antinocicepção observada após a injeção intraplantar do peptídeo se deve a uma ação local e/ou sistêmica. Para tanto, o pS100A9m (8µg/animal) foi administrado pela via intraplantar na pata contralateral à CCI (esquerda) e a hiperalgesia e a alodinia avaliadas na pata ipsolateral à cirurgia (direita).

De maneira semelhante ao observado com a injeção i.pl. do pS100A9m na pata ipsolateral à CCI, os resultados obtidos demonstraram que quando o peptídeo foi administrado na pata contralateral também ocorreu a reversão tanto da hiperalgesia (figura 13A) quanto da alodinia (figura 13B), observadas 14 dias após a constrição do nervo ciático. Animais tratados com o veículo (salina + HCl 0,01M), nas mesmas condições, foram utilizados como controle e não apresentaram alterações da resposta hiperalgésica e alodínica.

Figure 13. Efeito da injeção intraplantar de pS100A9m (8 μ g/pata), no lado contralateral à CCI, sobre a hiperalgesia (A) e alodinia (B). Os animais foram avaliados nos testes de pressão de pata e estimulação tátil, respectivamente, antes da CCI e após 14 dias, antes dos tratamentos e 1 hora após os mesmos. Ratos tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) foram avaliados como controle. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 a 8 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.6 Efeito do pS100A9m injetado pela via i.pl. sobre a hiperalgesia observada no 7º dia após a CCI

Considerando que o pS100A9m inibe a hiperalgesia decorrente da dor neuropática experimental já instalada (14 dias após CCI), avaliou-se a capacidade do pS100A9m em interferir com a hiperalgesia inflamatória que precede a instalação da dor crônica, observada 7 dias após a CCI.

Assim sendo, ratos submetidos ao teste de pressão de pata, antes do procedimento cirúrgico e no 7º dia do pós-cirúrgico, foram injetados pela via intraplantar com o pS100A9m, na dose de 8µg/animal, e o teste nociceptivo aplicado 1 hora após o tratamento. O pS100A9m nestas condições também reverteu a hiperalgesia inflamatória induzida pela CCI (figura 14).

Os animais controles, tratados com veículo (salina + HCl 0,01M), continuaram apresentando hiperalgesia 1 hora após o tratamento.

Figura 14 - Efeito do pS100A9m (8 μ g/pata) i.pl. sobre a hiperalgesia induzida após 7 dias da CCI. Os animais foram avaliados no teste de pressão de pata antes da CCI e após 7 dias, antes dos tratamentos e 1 hora após os mesmos. Ratos tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.7 Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática

Para se avaliar a possível participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo do pS100A9m, ratos submetidos à CCI e administrados com o peptídeo da S100A9 murina foram tratados com naloxona, um antagonista inespecífico destes receptores, e avaliados no teste de pressão de pata e no teste de estimulação tátil com filamentos de von Frey. Os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico e no 14º dia após a CCI, antes e depois dos tratamentos.

A naloxona i.pl. (1µg/animal) foi administrada imediatamente após a injeção do pS100A9m (8µ/pata) e os testes de pressão da pata e estimulação tátil aplicados 1 hora após o último tratamento.

Em outro protocolo experimental a naloxona foi administrada 15 minutos antes da realização dos testes nociceptivos, ou seja, 45 min após a administração do pS100A9m. Após 15 minutos do último tratamento os animais foram submetidos aos testes nociceptivos.

A naloxona injetada imediatamente após o pS100A9m não inibiu a reversão da hiperalgesia ou da alodinia induzidas pelo pS100A9m (figuras 15A e B). Da mesma forma, quando a naloxona foi administrada 15 minutos antes dos testes ela não alterou os efeitos anti-hiperalgésico e anti-alodínico induzidos pelo peptídeo (figuras 16A e B).

Ratos tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) do pS100A9m + salina ou veículo do pS100A9m + naloxona, nas mesmas condições experimentais descritas acima, foram avaliados como controles e não apresentaram alterações das respostas hiperalgésica (figuras 15A e 16A) e alodínica (figuras 15B e 16B) induzidas pela CCI. Ainda, ratos injetados com salina + pS100A9m apresentaram reversão da hiperalgesia e da alodinia.

Figura 15 – Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática. Ratos foram avaliados nos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da CCI e após 14 dias, antes dos tratamentos e 1 hora depois. O pS100A9m (8µg/pata) foi injetado imediatamente antes da naloxona (1µg/pata). Animais injetados com pS100A9m + salina, veículo + salina ou veículo + naloxona foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

Figura 16 – Efeito da administração de naloxona sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática. Ratos foram avaliados nos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da CCI e após 14 dias, antes e depois dos tratamentos. O pS100A9m (8µg/pata) foi injetado 45 minutos antes da naloxona (1µg/pata) e os testes comportamentais aplicados após 15 minutos do último tratamento. Animais injetados com pS100A9m + salina, veículo + salina ou veículo + naloxona foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.8 Efeito da administração de metisergida sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática

Com o intuito de avaliar a possível participação de receptores para serotonina no efeito antinociceptivo do pS100A9m, ratos submetidos à constrição do nervo ciático e administrados com o peptídeo C-terminal da S100A9 foram tratados com metisergida, um antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos, e avaliados no teste de pressão de pata e no teste de estimulação tátil. Os testes foram aplicados antes do procedimento cirúrgico e no 14º dia após a CCI, antes e depois dos tratamentos.

Assim, no 14º dia do pós-cirúrgico, após a realização dos testes nociceptivos, os ratos foram tratados com a metisergida via i.p. (5mg/kg) e depois de 30 minutos injetados com o pS100A9m (8µ/pata). Os testes de pressão da pata e estimulação tátil foram aplicados após 1 hora do último tratamento.

Como observado com a naloxona, a administração de metisergida não reverteu o efeito inibitório do pS100A9m sobre a hiperalgesia (figura 17A) ou a alodinia (figura 17B). Os ratos tratados com metisergida + veículo (salina + HCl 0,01M) do pS100A9m ou salina + veículo do pS100A9m e avaliados como controles continuaram apresentando hiperalgesia (A) e alodinia (B). O tratamento dos animais com salina + pS100A9m induziu inibição tanto da hiperalgesia (A) como da alodinia (B).

Figura 17 – Efeito da administração de metisergida sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a dor neuropática. Ratos foram avaliados nos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da CCI e após 14 dias, antes e depois dos tratamentos. A metisergida (5mg/kg) foi administrada via i.p. e o pS100A9m (8µg/pata) foi injetado após 30 minutos. Os testes nociceptivos foram aplicados após 1 hora do último tratamento. Animais injetados com salina + pS100A9m, salina + veículo ou metisergida + veículo foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 a 6 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.9 Efeito da administração de ioimbina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática

Com o objetivo de avaliar se receptores α_2 -adrenérgicos participam do efeito antinociceptivo do peptídeo C-terminal da S100A9, ratos submetidos à cirurgia para constrição do nervo ciático e injetados com pS100A9m foram tratados com ioimbina, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, e avaliados no teste de pressão de pata e no teste de estimulação tátil. Os testes foram aplicados antes da CCI e 14 dias depois, antes e após os tratamentos.

A ioimbina foi administrada por via endovenosa (1mg/kg) e imediatamente depois o pS100A9m foi injetado via i.pl. (8 μ /animal). Após 1 hora, os testes de pressão da pata e estimulação tátil foram novamente aplicados.

Como nos resultados anteriores, a ioimbina também não reverteu o efeito inibitório do pS100A9m sobre a hiperalgesia (figura 18A) ou a alodinia (figura 18B). Ratos tratados com ioimbina + veículo (salina + HCl 0,1M) do pS100A9m ou H₂O destilada + veículo do pS100A9m foram avaliados como controles e continuaram apresentando tanto hiperalgesia (A) quanto alodinia (B). Os animais tratados com H₂O destilada + pS100A9m apresentaram reversão de ambos os fenômenos (A e B).

Figura 18 – Efeito da administração de ioimbina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a dor neuropática. Ratos foram avaliados nos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da CCI e após 14 dias, antes dos tratamentos e 1 hora depois. A ioimbina (1mg/kg) foi administrada por via e.v., seguida do pS100A9m (8µg/pata). Animais injetados com H₂O destilada + pS100A9m, H₂O destilada + veículo ou ioimbina + veículo foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média ± e.p.m. de 6 a 9 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.10 Efeito da administração de bicuculina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática

A fim de verificar se receptores GABA_A podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo do peptídeo C-terminal da S100A9, ratos submetidos à CCI e injetados com pS100A9m foram tratados com bicuculina, um antagonista de receptores GABA_A, e avaliados nos testes de pressão de pata e de estimulação tátil. Estes testes foram aplicados antes da cirurgia e 14 dias depois, antes e após os tratamentos.

A bicuculina foi administrada pela via i.p. (0,5mg/kg) a após 15 minutos o pS100A9m foi injetado via i.pl. (8μ/animal). Após 1 hora do último tratamento os testes comportamentais foram novamente aplicados.

O tratamento dos animais com bicuculina não alterou a atividade inibitória do peptídeo sobre a hiperalgesia (figura 19A) ou alodinia (figura 19B). Os animais injetados com bicuculina + veículo (salina + HCl 0,01M) do pS100A9m ou salina + veículo do pS100A9m e avaliados como controles continuaram apresentando hiperalgesia (A) e alodinia (B). O tratamento dos animais com salina + pS100A9m induziu inibição tanto da hiperalgesia (A) como da alodinia (B).

Figura 19 – Efeito da administração de bicuculina sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a de dor neuropática. Os ratos foram submetidos aos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da constrição do nervo ciático e no 14º dia pós-cirúrgico, antes e depois dos tratamentos. A bicuculina (0,5mg/kg) foi administrada por via i.p. e o pS100A9m (8µg/pata) foi injetado 15 minutos depois. Os testes nociceptivos foram aplicados após 1 hora do último tratamento. Animais que receberam tratamento com salina + pS100A9m, salina + veículo ou bicuculina + veículo foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.11 Efeito da administração de saclofen sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m no modelo de dor neuropática

A possível participação de receptores GABA_B no efeito antinociceptivo do pS100A9m, em ratos submetidos à constrição do nervo ciático, foi avaliada empregando-se o saclofen, um antagonista de receptores GABA_B. Para tanto, os testes de pressão de pata e estimulação tátil foram aplicados antes da cirurgia e 14 dias depois, antes e após os tratamentos.

Assim, os animais foram tratados com o saclofen pela via i.t. (30µg/rato), 10 minutos antes da injeção i.pl. de pS100A9m (8µ/pata). Depois de 1 hora do último tratamento os testes nociceptivos foram realizados.

A administração de saclofen reverteu completamente o efeito inibitório do peptídeo C-terminal da S100A9 tanto sobre a hiperalgesia (figura 20A), quanto sobre a alodinia (figura 20B). Os animais utilizados como controles, injetados com saclofen + veículo (salina + HCl 0,01M) do pS100A9m ou com salina + veículo do pS100A9m, continuaram apresentando hiperalgesia (A) e alodinia (B). Por outro lado, os ratos tratados com salina + pS100A9m apresentaram inibição dos fenômenos nociceptivos.

Figura 20 – Efeito da administração de saclofen sobre a antinocicepção induzida pelo pS100A9m sobre a dor neuropática. Ratos foram avaliados nos testes de pressão de pata (A) e estimulação tátil (B) antes da constrição do nervo ciático e 14 dias após a cirurgia, antes e depois dos tratamentos. O saclofen (30µg/rato) foi administrado por via i.t. e o pS100A9m (8µg/pata) foi injetado após 10 minutos. Os testes nociceptivos foram aplicados após 1 hora do último tratamento. Os ratos tratados com salina + pS100A9m, salina + veículo ou saclofen + veículo foram submetidos aos testes nociceptivos e avaliados como controles, sendo veículo = salina + HCl 0,01M. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. # diferença significativa em comparação com os resultados obtidos antes da CCI ($p < 0,0001$).

4.12 Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula de ratos submetidos à CCI

A expressão de Egr-1 no CDME dos ratos submetidos à CCI foi avaliada pelo método de imuno-histoquímica, 7 ou 14 dias após a cirurgia. Os grupos experimentais utilizados foram formados de animais normais (sem lesão ou cirurgia), animais falso-operados, animais operados, animais operados e tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) ou animais operados e tratados com pS100A9m (8µg/pata). A perfusão e coleta das medulas foram realizadas 1 hora após os tratamentos.

Os valores foram expressos em número de núcleos marcados por área (mm²), quantificando-se os lados direito (LD) e esquerdo (LE) do CDME, sendo o lado direito, ipsilateral à lesão do nervo ciático, considerado como experimental, enquanto o esquerdo (contralateral) avaliado como controle.

Com relação aos dados obtidos no 7º dia após a CCI, foi observado um aumento de 17% na expressão de Egr-1 no lado direito do CDME dos animais operados em comparação com o lado esquerdo. Os animais operados e tratados com veículo obtiveram um aumento de 20% na expressão de Egr-1 no lado direito. Já, os animais operados e tratados com pS100A9m apresentaram expressão semelhante de Egr-1 em ambos os lados da medula espinhal. Estes resultados estão representados na figura 21 e ilustrados na figura 22.

Os resultados do 14º dia pós-CCI também demonstraram aumento na expressão de Egr-1 no lado direito da medula de ratos operados (14%) ou operados e tratados com veículo (14%), em comparação com o lado esquerdo. Por outro lado, os animais operados e tratados com pS100A9m tiveram uma redução (27%) na expressão desta proteína no lado ipsilateral à lesão do ciático (figuras 23 e 24).

Ratos normais e falso-operados apresentaram expressão semelhante de Egr-1 nos lados direito e esquerdo do CDME (dados não mostrados).

Figura 21 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula espinhal de ratos 7 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 7º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – Salina + HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de Egr-1 nos cornos dorsais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op) foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 animais por grupo. * diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,05$).

Figura 22 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Egr-1 da região de corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 7 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8µg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

Figura 23 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 na medula de ratos 14 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 14º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – Salina + HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de Egr-1 nos cornos dorsais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op) foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados representam a média ± e.p.m. de 7 a 8 animais por grupo. * diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,05$). **diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,005$).

Figura 24 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Egr-1 da região de corno dorsal da medula espinhal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 14 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8µg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

4.13 Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos submetidos à CCI

A expressão de Fos no CDME dos ratos submetidos à CCI foi avaliada pelo método de imuno-histoquímica, 7 ou 14 dias após a cirurgia. Os grupos experimentais utilizados foram formados de animais normais (brancos), animais falso-operados, animais operados, animais operados e tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) ou animais operados e tratados com pS100A9m (8µg/pata). A perfusão e coleta das medulas foram realizadas 1 hora após os tratamentos.

Os valores foram expressos em número de núcleos marcados por área (mm²), quantificando-se os lados direito (LD) e esquerdo (LE) do CDME, sendo o lado direito, ipsilateral à lesão do nervo ciático, considerado como experimental, enquanto o esquerdo (contralateral) avaliado como controle.

Os dados obtidos 7 dias após a CCI demonstram que houve um aumento de 11% na expressão de Fos no lado direito do CDME dos animais operados, em relação ao lado esquerdo. Os animais operados e tratados com veículo apresentaram um aumento similar ao grupo anterior (10%) na expressão de Fos no lado direito. Por outro lado, animais operados e tratados com pS100A9m apresentaram redução (25%) na expressão desta proteína no lado direito, quando comparado com o lado esquerdo (figuras 25 e 26).

Os resultados referentes ao 14º dia pós-cirúrgico demonstraram uma expressão semelhante de Fos em ambos os lados da medula espinhal de ratos operados. Já, o grupo composto por ratos operados e tratados com veículo apresentou aumento de 12% na expressão de Fos do lado direito em relação ao esquerdo. Ainda, os animais operados e tratados com pS100A9m tiveram uma acentuada redução na expressão desta proteína (42%) no lado ipsilateral à lesão do ciático (figuras 27 e 28).

Assim como nos resultados obtidos com a Egr-1, ratos normais e falso-operados apresentaram expressão semelhante de Fos nos lados direito e esquerdo do CDME (dados não mostrados).

Figura 25 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos 7 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 7º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – salina+HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de Fos nos cornos dorsais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op) foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 animais por grupo. * diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,05$).

Figura 26 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Fos da região de corno dorsal da medula espinal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos 7 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8µg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

Figura 27 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos na medula de ratos 14 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 14º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – Salina + HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de Fos nos cornos dorsais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op) foram submetidos aos mesmos protocolos e avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 a 9 animais por grupo. * diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,05$). ***diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,0005$).

Figura 28 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para Fos da região de corno dorsal da medula espinal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de Fos 14 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8µg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

4.14 Efeito da administração i.pl. do pS100A9m sobre a expressão de TNF α na medula de ratos submetidos à CCI

A expressão de TNF α no corno ventral da medula espinhal dos ratos submetidos à CCI foi avaliada pelo método de imuno-histoquímica, 7 ou 14 dias após a cirurgia. Os grupos experimentais utilizados foram formados de animais normais (brancos), animais falso-operados, animais operados, animais operados e tratados com veículo (salina + HCl 0,01M) ou animais operados e tratados com pS100A9m (8 μ g/pata). A perfusão e coleta das medulas foram realizadas 1 hora após os tratamentos.

Os valores foram expressos em número de células marcadas por área (mm²), quantificando-se os lados direito (LD) e esquerdo (LE) do corno ventral da medula espinhal, sendo o lado direito, ipsilateral à lesão do nervo ciático, considerado como experimental, enquanto o esquerdo (contralateral) avaliado como controle.

Os resultados obtidos após 7 dias da CCI demonstraram um aumento de 15% na expressão de TNF α no lado direito do corno ventral da medula, em relação ao lado esquerdo, dos animais operados e 16% dos animais operados e tratados com veículo. Ainda, os animais operados e tratados com pS100A9m apresentaram uma redução de 29% da expressão no corno ventral direito em relação ao lado esquerdo (figuras 29 e 30).

Os resultados obtidos 14 dias após a CCI demonstraram que não houve diferença de expressão do TNF α quando comparado o lado direito com o esquerdo do corno ventral da medula espinhal dos animais, em todos os grupos avaliados (figuras 31 e 32).

Ratos normais ou falso-operados apresentaram expressão semelhante de TNF α nos lados direito e esquerdo do corno ventral da medula (dados não mostrados).

Figura 29 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de $\text{TNF}\alpha$ na medula de ratos 7 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 7º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – Salina + HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de $\text{TNF}\alpha$ nos cornos ventrais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op.) foram submetidos ao mesmo protocolo. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 6 a 7 animais por grupo. * diferença significativa em comparação com o lado controle (LE) – contralateral a CCI ($p < 0,05$).

Figura 30 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para $TNF\alpha$ da região de corno ventral da medula espinal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de $TNF\alpha$ 7 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8μg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

Figura 31 – Efeito do pS100A9m sobre a expressão de $\text{TNF}\alpha$ na medula de ratos 14 dias após a CCI. Os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático direito e no 14º dia pós-cirúrgico tratados com o peptídeo – 8µg/pata (Op+P) ou com o veículo – Salina + HCl 0,01M (Op+V). Após 1 hora dos tratamentos os animais foram perfundidos, os fragmentos da medula espinhal lombar coletados, cortados a uma espessura de 14µm, imuno-marcados e analisados quanto à expressão de $\text{TNF}\alpha$ nos cornos ventrais direito (LD) e esquerdo (LE). Animais operados (Op.) foram submetidos aos mesmos protocolos e avaliados como controles. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 7 a 8 animais por grupo.

Figura 32 – Imagens digitais dos cortes imuno-marcados para $\text{TNF}\alpha$ da região de corno ventral da medula espinal lombar de ratos. Ilustrando o efeito do pS100A9m sobre a expressão de $\text{TNF}\alpha$ 14 dias após a CCI. Estão representados animais operados (A), operados e tratados com veículo – salina + HCl 0,01M (B) e operados e tratados com pS100A9m – 8μg/pata (C). As imagens foram obtidas com objetiva de 4x em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E1000) acoplado à câmera digital (Nikon® DXM1200).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a proteína ligante de cálcio S100A9 possui efeito antinociceptivo sobre a dor inflamatória experimental (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2002; PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006). Posteriormente, verificamos que a extremidade C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) também demonstrou atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor inflamatória aguda (DALE, 2002; DALE et al., 2004; DALE et al., 2006a; DALE et al., 2006b).

Considerando que a dor neuropática resulta, na maioria das vezes, de lesão de nervo periférico e é um tipo de dor crônica de difícil tratamento, este estudo avaliou o efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática produzida pela constrição crônica (CCI) do nervo ciático, modelo experimental proposto por Bennet e Xie (1988) (BENNETT; XIE, 1988). Foram ainda investigados alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na antinocicepção produzida pelo pS100A9m sobre este modelo de dor crônica.

A lesão de nervos periféricos normalmente induz dor neuropática em humanos, a qual se manifesta por hiperalgesia, alodinia e dor espontânea (PAYNE; NORFLEET, 1986; DEVOR; WALL, 1990; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). De maneira semelhante, a CCI causa em animais os três fenômenos observados em humanos (BENNETT; XIE, 1988).

A constrição crônica do nervo ciático é um modelo de lesão de nervo periférico já bem estabelecido (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005; GRELIK; BENNETT; RIBEIRO-DA-SILVA, 2005), que produz respostas nociceptivas mais estáveis e intensas quando comparada com outros modelos de lesão de nervo. Em comparação com outros modelos, a CCI apresenta ainda baixa incidência de autotomia (cerca de 1 animal por grupo) (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005). Em nossas condições experimentais, menos de um animal por grupo desenvolveu autotomia e estes animais não foram utilizados em nossos protocolos.

A escolha do 14º dia pós-cirúrgico para a realização dos estudos do efeito antinociceptivo sobre a dor neuropática se deu não apenas pelos dados da literatura (ATTAL et al., 1990; CATHELINE et al., 1999), mas também pelos testes desenvolvidos em nosso laboratório, em que os animais foram observados por até

75 dias após a CCI sendo que, ainda neste período, foi detectada a presença de hiperalgesia, alodinia e dor espontânea (GUTIERREZ, 2005). Em adição, estes resultados confirmam os observados por Bennett e Xie (1988) (BENNETT; XIE, 1988), que detectaram a dor neuropática por pelo menos até 90 dias após a CCI (BENNETT; XIE, 1988). Considera-se que a resposta nociceptiva, neste modelo, tem início no 1º dia pós-operatório e atinge picos em tempos distintos de acordo com o teste nociceptivo aplicado, tornando-se consideravelmente estável ao redor do 10º dia após a cirurgia (DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005).

Com relação ao efeito do peptídeo C-terminal da S100A9 murina sobre os sinais característicos da dor neuropática experimental, no modelo aqui empregado, nossos dados demonstraram que o pS100A9m inibiu completamente a hiperalgesia, a alodinia e a dor espontânea no 14º dia após a CCI. Este efeito foi observado quando o peptídeo foi administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal. Contudo, a dose necessária para inibir a dor neuropática dos ratos com CCI foi menor quando o pS100A9m foi administrado pela via intratecal (0,5 e 1 µg/animal), em comparação com as vias intraplantar e oral (8 µg/animal). Cabe ressaltar que a dose de pS100A9m injetada por via intraplantar para reverter a hiperalgesia, no modelo de dor neuropática, foi maior do que a dose (1 µg/pata) utilizada para inibir a hiperalgesia inflamatória aguda induzida por carragenina (DALE et al., 2006b). Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato de que os mecanismos envolvidos no desencadeamento da dor neuropática são bem mais complexos do que na dor aguda, os quais envolvem desde a degeneração de fibras A e da maioria das fibras C (BASBAUM et al., 1991; CARLTON et al., 1991) até a sensibilização central (SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Assim, a complexidade dos mecanismos envolvidos na dor crônica exigiria altas doses do pS100A9m para bloquear a nocicepção observada no modelo da CCI.

A injeção intraplantar do pS100A9m foi utilizada para caracterizar o seu efeito local. Porém, mesmo quando injetado na pata contralateral à CCI, o efeito antinociceptivo do peptídeo foi mantido, sugerindo uma ação sistêmica do pS100A9m no controle da dor neuropática. Além disso, a administração oral de pS100A9m inibiu os sinais de nocicepção, demonstrando que este peptídeo possui uma ação sistêmica que não sofre interferência da ação do suco gástrico. Por outro lado, além da atividade periférica, o pS100A9m também possui efeito antinociceptivo por uma ação central, uma vez que inibe os comportamentos nociceptivos quando

injetado pela via intratecal. Estes dados indicam que possivelmente o pS100A9m tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e interferir com a transmissão central do impulso nociceptivo.

Diversas alterações fisiopatológicas associadas com a sensibilização central, na presença de lesão de nervo periférico, contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia, alodinia e dor espontânea durante a dor neuropática (DEVOR; WALL, 1990; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Desde que o pS100A9m inibe os sinais que caracterizam a dor neuropática no modelo da CCI, é plausível sugerir que este peptídeo interfere com os mecanismos envolvidos neste tipo de dor mesmo após o desenvolvimento das alterações centrais decorrentes deste processo.

O efeito antinociceptivo do pS100A9m, observado pelas três vias de administração aqui utilizadas, tem início rápido e é detectado logo após 1 hora da sua administração. A duração da antinocicepção induzida por este peptídeo varia de acordo com a via de administração empregada. Pela via intratecal, o pS100A9m induz uma reversão de curta duração sobre a hiperalgesia e a alodinia, enquanto a injeção intraplantar produz uma inibição mais longa sobre os dois fenômenos. Já, a administração oral do pS100A9m produz um efeito inibitório mais prolongado sobre a hiperalgesia do que sobre a alodinia. Estes resultados sugerem que o efeito tempo-dependente induzido pelo pS100A9m pode estar relacionado às diferenças na metabolização deste peptídeo de acordo com a via utilizada. Além disso, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia são distintos (CAVIEDES; HERRANZ, 2002), o que poderia explicar as diferenças observadas entre os tempos de ação em cada fenômeno.

Cabe ressaltar que a administração do veículo do peptídeo não altera a nocicepção observada após a lesão do nervo ciático. Ainda, animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem lesão do nervo e que, portanto, não manifestam sinais de nocicepção não demonstram alteração no limiar nociceptivo após a administração do peptídeo C-terminal da S100A9.

Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a administração de indometacina, um inibidor da cicloxigenase, no 1° ou 7° dia após a CCI, reverteu a hiperalgesia, alodinia e dor espontânea, porém sem interferir com estes fenômenos no 14° dia após a lesão do nervo ciático de ratos, sugerindo que os fenômenos nociceptivos observados nos primeiros dias após a cirurgia são de origem

inflamatória, mediados por prostanóides, e não decorrentes apenas do processo de cronificação da dor (GUTIERREZ, 2005).

Com base nestas observações, e no fato de que o pS100A9m inibe a hiperalgesia inflamatória aguda (DALE et al., 2006b), decidiu-se investigar o efeito do peptídeo sobre a hiperalgesia observada no 7º dia após a CCI, a fim de avaliar a ação do pS100A9m sobre os componentes inflamatórios que participam da instalação do processo crônico de dor. Os resultados obtidos demonstram que o pS100A9m administrado pela via intraplantar, na mesma dose utilizada nos experimentos realizados no 14º dia após a cirurgia, também possui efeito anti-hiperalgésico em ratos submetidos à CCI. O efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia observada tanto no 7º dia, quanto no 14º dia após a CCI, sugere que este peptídeo é capaz de interferir não só com os mecanismos de ação centrais envolvidos na hiperalgesia neuropática, mas também com os mediadores algogênicos que participam do processo inflamatório que antecede a instalação desta hiperalgesia.

Após a determinação da presença do efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática experimental, o passo seguinte deste trabalho foi investigar alguns dos prováveis mecanismos responsáveis por este efeito.

Tendo em vista que o tratamento da dor neuropática envolve fármacos com diferentes mecanismos de ação, dentre os quais encontram-se opióides e fármacos que agem sobre neurotransmissores como a serotonina, a NE e o GABA (CAVIEDES; HERRANZ, 2002), foi avaliada a possível ação do pS100A9m sobre receptores opioidérgicos, serotoninérgicos, α_2 -adrenérgicos e gabaérgicos no modelo de dor neuropática aqui empregado.

Dados anteriores, obtidos pelo nosso grupo, já haviam demonstrado que os peptídeos opióides não participam do efeito antinociceptivo, mediado pela proteína S100A9, observado após injeção de carragenina ou zimosan, em animais submetidos ao teste das contorções abdominais (PAGANO, 2001; PAGANO et al., 2002). De maneira semelhante, foi recentemente demonstrado que os receptores opióides também não estão envolvidos com o efeito antinociceptivo do peptídeo C-terminal da S100A9 murina sobre a hiperalgesia inflamatória aguda induzida pela carragenina, em diferentes modelos de avaliação da sensibilidade dolorosa (DALE et al., 2007).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que o efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática induzida pela CCI não foi revertido pelo antagonista inespecífico de receptores opióides, a naloxona. Estes dados sugerem, mais uma vez, que o efeito inibitório do pS100A9m, seja sobre a dor aguda ou neuropática, não está relacionado com o sistema opióide.

Com relação ainda à avaliação da participação de receptores envolvidos com a via inibitória central de dor, foi demonstrado que a utilização de antagonistas de receptores serotoninérgicos, α_2 -adrenérgicos ou mesmo gabaérgicos do tipo A não alterou a antinocicepção induzida pelo peptídeo. Assim, os resultados obtidos indicam que o efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática também não se deve a uma ação deste peptídeo sobre aqueles três tipos de receptores.

Cabe ressaltar que as doses e vias dos antagonistas empregados neste estudo foram aplicadas conforme dados de literatura obtidos de trabalhos onde também eram avaliados animais submetidos a modelos diversos de nocicepção (ARAN; HAMMOND, 1991; NAM et al., 2000; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; CHACUR et al., 2002; AKADA et al., 2005; AKADA et al., 2006).

Contudo, a bicuculina, antagonista de receptor GABA_A, foi administrada pela via intraperitoneal (SHAFIZADEH et al., 1997; AKADA et al., 2005; AKADA et al., 2006), sendo que alguns estudos demonstram que ela não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica em ratos adultos (REMLER; MARCUSSEN, 1985; REMLER; MARCUSSEN; TILLER-BORSICH, 1986; BRIONI; MCGAUGH, 1988; LIMMROTH; LEE; MOSKOWITZ, 1996; MARES et al., 2000). Em geral, a bicuculina é utilizada pela via intratecal (NADESON; GOODCHILD, 1997; MALAN; MATA; PORRECA, 2002; LIM et al., 2006) e neste trabalho ela foi utilizada na dose de 30µg/animal. No entanto, quando empregada por esta via e nesta dose, em nossos experimentos, a bicuculina causou alterações comportamentais severas nos animais, impossibilitando a avaliação dos mesmos nos testes nociceptivos. Desta forma, não é possível descartar completamente o efeito do pS100A9m sobre receptores gabaérgicos do tipo A. A fim de melhor esclarecer a participação destes receptores no efeito do pS100A9m, novos testes estão sendo realizados com doses menores deste antagonista injetado pela via intratecal.

A administração do antagonista de receptores GABA_B, o saclofen, reverteu completamente a antinocicepção induzida pelo pS100A9m, sugerindo que este

peptídeo age sobre a dor neuropática induzida pela CCI por um mecanismo dependente de receptores GABA_B.

No CDME, a ativação de interneurônios gabaérgicos inibe a liberação de neurotransmissores nociceptivos excitatórios (MALCANGIO; BOWERY, 1996). Desta forma, estes interneurônios atuam contra o fluxo de sinais nociceptivos e o GABA atua inibindo dores agudas ou persistentes (RIEDEL; NEECK, 2001).

Fármacos que atuam em receptores gabaérgicos, em geral, promovem o aumento da transmissão sináptica inibitória (BASBAUM; JESSELL, 2003) e reduzem a liberação de neurotransmissores pelos aferentes nociceptivos (RIEDEL; NEECK, 2001). A administração de agonistas de receptores GABA_A ou GABA_B reverte a alodinia e a hiperalgesia induzidas por lesão de nervo (MALAN; MATA; PORRECA, 2002). Ainda, agonistas de receptores GABA são geralmente classificados como antiepiléticos e, uma vez que reduzem a excitabilidade dos neurônios, são considerados uns dos melhores tratamentos para a dor neuropática (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

O uso de agonistas de receptores GABA_B demonstra efeito analgésico em modelos de dor por inibição da liberação de glutamato pelas fibras A e C na substância gelatinosa e/ou pela diminuição da expressão de receptor NK-1 no CDME (FRANEK; VACULIN; ROKYTA, 2004). Estes fármacos têm potente efeito antinociceptivo em doses que produzem pequeno ou nenhum comprometimento motor (SLONIMSKI; ABRAM; ZUNIGA, 2004), podendo inclusive melhorar a mobilidade dos pacientes (OCHS, 1993).

Pelo exposto acima, com base nos resultados obtidos com o saclofen sobre a antinocicepção do pS100A9m, é possível que este peptídeo promova seu efeito, durante a dor neuropática induzida pela CCI, por um aumento da atividade gabaérgica inibitória e conseqüente redução da transmissão excitatória dos estímulos dolorosos. Esta hipótese colocaria o peptídeo C-terminal da S100A9 murina como um provável agente terapêutico para o controle da dor neuropática originária de lesão de nervos. Contudo, maiores investigações são necessárias para se avaliarem os possíveis efeitos adversos que este peptídeo poderia causar ao longo do tempo em animais submetidos à CCI.

Dando continuidade aos estudos referentes aos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do peptídeo C-terminal da S100A9 sobre a dor neuropática, foi também avaliado o efeito deste peptídeo, administrado por via intraplantar, sobre

a expressão de Egr-1, Fos e TNF α na medula de ratos submetidos à CCI, 7 ou 14 dias após a cirurgia, sendo o 7º dia considerado como marcador do período de instalação da dor crônica e o 14º dia o momento onde este processo já está instalado.

O *egr-1* e o *c-fos* são descritos como genes de expressão rápida (*immediate early genes* - IEGs), que sinalizam atividade de células do sistema nervoso (ZIMMERMANN, 1992; LANTERI-MINET et al., 1993). É descrito na literatura que a ativação destes genes ocorre em diversas condições fisiológicas ou patológicas (ZIMMERMANN, 1992), inclusive na nocicepção (KO et al., 2005).

Resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo demonstraram que o pS100A9m inibe a expressão de Egr-1 no CDME de ratos em modelo de hiperalgesia aguda induzida pela administração intraplantar do PAR₂AP (DALE et al., 2006a).

No modelo de dor neuropática aqui empregado, foi comparada a expressão de Egr-1 nos lados direito (ipsolateral à CCI) e esquerdo (contralateral à CCI) do CDME dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que em ratos submetidos à CCI e que não receberam qualquer tratamento ou foram tratados com o veículo do peptídeo apresentaram maior expressão de Egr-1 no lado da medula ipsolateral à cirurgia, tanto durante a instalação da dor crônica quanto depois do processo já instalado. Assim, foi observado que a CCI induz aumento da expressão de Egr-1 no CDME ipsolateral à lesão desde a fase de desenvolvimento da dor neuropática até a cronificação do processo, sugerindo um aumento da atividade neuronal da medula espinhal durante a lesão parcial do nervo ciático.

Em animais tratados com o pS100A9m, na fase de instalação da dor neuropática, a expressão de Egr-1 foi semelhante nos dois lados da medula, enquanto que o tratamento após a cronificação da dor demonstrou redução na expressão desta proteína no lado ipsolateral à CCI, em comparação com o lado contralateral. Estes dados sugerem que o pS100A9m inibe a expressão de Egr-1 no CDME após as alterações centrais decorrentes da instalação da dor crônica, provavelmente por uma inibição na atividade de neurônios presentes na medula dos ratos submetidos à CCI.

Em relação à proteína Fos, dados da literatura demonstram que a CCI resulta em hiperalgesia unilateral persistente, acompanhada de aumento na expressão desta proteína no lado ipsolateral da medula espinhal lombar (KAWAHARA et al.,

2001). Porém, cabe ressaltar que a expressão desta proteína não é específica para processos nociceptivos, podendo estar relacionada ao estresse, à atividade motora ou mesmo às alterações de sono que ocorrem nessas situações (HARRIS, 1998).

Os estudos que utilizam a proteína Fos como ferramenta para avaliação da atividade neuronal, em modelo de nocicepção, apresentam resultados controversos. Assim, em algumas situações não são detectadas alterações no número e distribuição de neurônios marcados para Fos, após diversas modalidades de estímulos nocivos periféricos (CATHELIN et al., 1999), e em outras se observa um aumento nessa expressão por mais de 14 dias após a lesão (KAWAHARA et al., 2001). Esta irregularidade de resposta pode ser explicada por um aumento da expressão no lado contralateral, devido, por exemplo, à ativação descendente dos circuitos antinociceptivos (HARRIS, 1998).

No presente trabalho também foi avaliada a expressão de Fos comparando-se os lados direito (ipsolateral à CCI) e esquerdo (contralateral à CCI) do CDME. Em animais com CCI que não foram tratados ou que receberam tratamento apenas com veículo, na fase de instalação da dor neuropática, houve aumento da expressão de Fos no lado ipsolateral à lesão do nervo. Em contrapartida, ocorreu uma diminuição na expressão no lado ipsolateral à CCI dos animais tratados com pS100A9m.

Após a instalação da dor crônica, os ratos que não receberam tratamento demonstraram expressão semelhante de Fos nos lados direito e esquerdo da medula, enquanto os tratados com veículo apresentaram aumento no lado ipsolateral. Já os ratos tratados com o peptídeo C-terminal da S100A9 murina tiveram uma redução na expressão de Fos no lado correspondente à CCI, em comparação com o lado contralateral. Os resultados obtidos, semelhantes ao observado para Egr-1, também sugerem que o pS100A9m interfere com a expressão de Fos em neurônios espinhais, tanto durante quanto depois da instalação da dor neuropática, confirmando uma ação deste peptídeo sobre a atividade neuronal na medula durante a CCI.

Como parte ainda do estudo de imuno-marcação, foi também avaliada a expressão do $\text{TNF}\alpha$ na medula de ratos submetidos à CCI e tratados com o pS100A9m. Assim como nos dados anteriores, foi comparada a expressão nos lados direito (ipsolateral à CCI) e esquerdo (contralateral à CCI) da medula espinhal, porém neste caso, nos cornos ventrais da mesma, já que o $\text{TNF}\alpha$ é expresso por

motoneurônios presentes no corno ventral da medula (DELEO; COLBURN; RICKMAN, 1997). Esta citocina está envolvida com a dor neuropática (DELEO; COLBURN; RICKMAN, 1997; GEORGE; BUEHL; SOMMER, 2004; IGNATOWSKI et al., 2005), tanto no início do processo (GEORGE et al., 1999; GEORGE; BUEHL; SOMMER, 2004) quanto no 14º dia após a CCI (OKAMOTO et al., 2001). Alguns autores sugerem ainda que o $TNF\alpha$ de origem central participa do desenvolvimento da dor neuropática precocemente e, tardiamente, contribui com a resolução do processo doloroso decorrente da CCI (IGNATOWSKI et al., 2005).

Nossos resultados demonstraram que durante a instalação da dor crônica a expressão do $TNF\alpha$ se encontra aumentada no corno ventral da medula no lado ipsilateral à CCI, em comparação com o lado contralateral, tanto nos ratos que não foram submetidos a nenhum tratamento, quanto naqueles tratados com veículo do peptídeo. Por outro lado, o pS100A9m induziu uma inibição da expressão desta citocina no lado ipsilateral da medula. Contudo, após a cronificação da dor, os animais que não receberam tratamento, bem como aqueles tratados com veículo ou com pS100A9m apresentaram expressão semelhante de $TNF\alpha$ em ambos os lados da medula espinhal. Assim, os dados obtidos com a imuno-marcação para $TNF\alpha$ no corno ventral da medula ipsilateralmente à CCI demonstram que a expressão desta citocina encontra-se aumentada apenas na fase de instalação da dor neuropática, e ainda que o pS100A9m é capaz de inibir este fenômeno.

Considerando estes resultados, em conjunto com os dados anteriores que demonstram que o pS100A9m interfere com os mecanismos envolvidos na hiperalgesia inflamatória observada no 7º dia após a CCI e também os dados de literatura que indicam o envolvimento do $TNF\alpha$ na hiperalgesia observada nesse período (IGNATOWSKI et al., 2005), pode-se sugerir que o pS100A9m modula a dor inflamatória que precede a dor crônica por uma ação direta ou indireta sobre a citocina pró-inflamatória $TNF\alpha$.

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram que o peptídeo C-terminal da S100A9 murina inibe a dor neuropática experimental e sugerem que este efeito é dependente de receptores gabaérgicos do tipo B, provavelmente acarretando na inibição da atividade neuronal traduzida pela redução na expressão de Egr-1 e Fos.

Assim, os dados anteriores obtidos pelo nosso grupo, que descrevem a atividade inibitória do pS100A9m sobre a nocicepção em modelos de dor

inflamatória aguda (DALE, 2002; DALE et al., 2006a; DALE et al., 2006b), bem como os dados aqui descritos, sugerem que o C-terminal da proteína S100A9 murina pode ter potencial terapêutico no controle das dores aguda e persistente.

Resumo dos resultados

6 RESUMO DOS RESULTADOS

A avaliação do efeito do peptídeo C-terminal da S100A9 murina sobre o modelo de constrição crônica do nervo ciático para indução da dor neuropática, bem como dos mecanismos envolvidos neste efeito, demonstraram que:

- ✓ O pS100A9m inibe a hiperalgesia, a alodinia e a dor espontânea quando administrado pelas vias intraplantar, oral ou intratecal;
- ✓ A duração do efeito antinociceptivo do pS100A9m varia de acordo com a via de administração utilizada e o fenômeno nociceptivo avaliado;
- ✓ A injeção intraplantar do pS100A9m bloqueia a hiperalgesia inflamatória que ocorre durante a instalação da dor neuropática;
- ✓ A administração de antagonistas dos receptores opióides, α_2 -adrenérgicos, serotoninérgicos ou gabaérgicos do tipo A não altera a antinocicepção induzida pelo pS100A9m;
- ✓ O antagonista de receptor GABA_B reverteu completamente o efeito antinociceptivo do pS100A9m sobre a dor neuropática;
- ✓ O pS100A9m injetado pela via intraplantar inibe a expressão de Egr-1 e Fos por neurônios do corno dorsal da medula, tanto durante o desenvolvimento da dor neuropática, como após a sua instalação;
- ✓ A expressão de TNF α pelos motoneurônios do corno ventral da medula espinhal foi inibida pelo pS100A9m na fase de instalação da dor crônica;

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo nos permitem concluir que o C-terminal da proteína ligante de cálcio S100A9 murina é capaz de interferir com os mecanismos inflamatórios envolvidos na instalação da dor neuropática, que envolve a inibição da expressão do $\text{TNF}\alpha$ na medula de animais submetidos à constrição crônica do nervo ciático. Ainda, este peptídeo inibe a dor neuropática experimental por um mecanismo que envolve receptores gabaérgicos do tipo B, o que provavelmente leva a inibição da atividade de neurônios espinhais. Desta forma, o peptídeo C-terminal da proteína S100A9 murina pode representar uma ferramenta importante para o estudo da dor neuropática e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas eficazes contra a este tipo de dor.

Referências

8 REFERÊNCIAS

- ABDULLA, F. A.; SMITH, P. A. Axotomy reduces the effect of analgesic opioids yet increases the effect of nociceptin on dorsal root ganglion neurons. **J Neurosci**, v.18, n.23, p.9685-94. 1998.
- 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. **J Leukoc Biol**, v.62, n.6, p.852-8. 1997.
- AKADA, Y.; MORI, R.; KATO, Y.; YAMASAKI, F.; MOCHIZUKI, H. Analgesic properties of the novel compound M43068 in rat models of acute and neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v.523, n.1-3, p.46-53. 2005.
- AKADA, Y.; MORI, R.; MATSUURA, K.; SUZUKI, K.; KATO, K.; KAMIYA, M.; NABA, H.; KUROKAWA, M.; OGIHARA, T.; KATO, Y.; YAMASAKI, F.; YAMAMOTO, I. Pharmacological profiles of the novel analgesic M58996 in rat models of persistent and neuropathic pain. **J Pharmacol Sci**, v.102, n.2, p.205-12. 2006.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v.111, n.2, p.389-97. 2002.
- ALTIER, C.; ZAMPONI, G. W. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n.9, p.465-70. 2004.
- ANDERSSON, K. B.; SLETTEN, K.; BERNTZEN, H. B.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; JELLUM, E.; FAGERHOL, M. K. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. **Scand J Immunol**, v.28, n.2, p.241-5. 1988.
- ARAN, S.; HAMMOND, D. L. Antagonism of baclofen-induced antinociception by intrathecal administration of phaclofen or 2-hydroxy-saclofen, but not delta-aminovaleric acid in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v.257, n.1, p.360-8. 1991.
- ARNER, S.; MEYERSON, B. A. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. **Pain**, v.33, n.1, p.11-23. 1988.

ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **Clin J Pain**, v.16, n.3 Suppl, p.S118-30. 2000.

ATTAL, N.; JAZAT, F.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, v.41, n.2, p.235-51. 1990.

BACKONJA, M. M. Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**, v.59, n.5 Suppl 2, p.S14-7. 2002.

_____. Defining neuropathic pain. **Anesth Analg**, v.97, n.3, p.785-90. 2003.

BARDIN, L.; SCHMIDT, J.; ALLOUI, A.; ESCHALIER, A. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. **Eur J Pharmacol**, v.409, n.1, p.37-43. 2000.

BARON, R.; LEVINE, J. D.; FIELDS, H. L. Causalgia and reflex sympathetic dystrophy: does the sympathetic nervous system contribute to the generation of pain? **Muscle Nerve**, v.22, n.6, p.678-95. 1999.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann Neurol**, v.4, n.5, p.451-62. 1978.

BASBAUM, A. I.; GAUTRON, M.; JAZAT, F.; MAYES, M.; GUILBAUD, G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. **Pain**, v.47, n.3, p.359-67. 1991.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. A percepção da dor. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T, M. **Princípios da neurociência**. Barueri, SP: Manole, 2003. p.472-491.

BEHBEHANI, M. M.; FIELDS, H. L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Res**, v.170, n.1, p.85-93. 1979.

BENNETT, G. J. Neuropathic pain: a crisis of definition? **Anesth Analg**, v.97, n.3, p.619-20. 2003.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v.33, n.1, p.87-107. 1988.

BERTHIER, M.; STARKSTEIN, S.; LEIGUARDA, R. Asymbolia for pain: a sensory-limbic disconnection syndrome. **Ann Neurol**, v.24, n.1, p.41-9. 1988.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, n.9164, p.1610-5. 1999.

BIAN, D.; NICHOLS, M. L.; OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; PORRECA, F. Characterization of the antiallodynic efficacy of morphine in a model of neuropathic pain in rats. **Neuroreport**, v.6, n.15, p.1981-4. 1995.

BONICA, J. J. Causalgia and other reflex sympathetic dystrophies. In: **The management of pain**. Philadelphia: Lea; Febinger, 1990. p.220-243.

BORMANN, J.; FEIGENSPAN, A. GABAC receptors. **Trends Neurosci**, v.18, n.12, p.515-9. 1995.

BOSWELL, G.; BEKERSKY, I.; MEKKI, Q.; EISENACH, J. Plasma concentrations and disposition of clonidine following a constant 14-day epidural infusion in cancer patients. **Clin Ther**, v.19, n.5, p.1024-30. 1997.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W.; RICE, A. S. Mechanisms of neuropathic pain. **Br J Anaesth**, v.87, n.1, p.12-26. 2001.

BRIONI, J. D.; MCGAUGH, J. L. Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. **Psychopharmacology (Berl)**, v.96, n.4, p.505-10. 1988.

BRUN, J. G.; HALAND, G.; HAGA, H. J.; FAGERHOL, M. K.; JONSSON, R. Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. **Apmis**, v.103, n.3, p.233-40. 1995.

BURKEY, A. R.; CARSTENS, E.; JASMIN, L. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. **J Neurosci**, v.19, n.10, p.4169-79. 1999.

CAILLIET, R. **Dor: Mecanismos e tratamento**. Porto alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA, 1993. p. 274-284.

CARLTON, S. M.; DOUGHERTY, P. M.; POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. **Neurosci Lett**, v.131, n.1, p.88-92. 1991.

CARPENTER, D.; LUNDBERG, A.; NORRSELL, U. Effects from the pyramidal tract on primary afferents and on spinal reflex actions to primary afferents. **Experientia**, v.18, p.337-8. 1962.

CATHELINE, G.; LE GUEN, S.; BESSON, J. M. Intravenous morphine does not modify dorsal horn touch-evoked allodynia in the mononeuropathic rat: a Fos study. **Pain**, v.92, n.3, p.389-98. 2001.

CATHELINE, G.; LE GUEN, S.; HONORE, P.; BESSON, J. M. Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? **Pain**, v.80, n.1-2, p.347-57. 1999.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. [Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain]. **Rev Neurol**, v.35, n.11, p.1037-48. 2002.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; GAZDA, L. S.; ARMSTRONG, C.; WANG, H. C.; TRACEY, K. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. **Pain**, v.94, n.3, p.231-244. 2001.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, v.108, n.1-2, p.180-91. 2004.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, v.40, n.7, p.1047-1051. 2002.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, n.1, p.55-63. 1994.

CHEBIB, M. GABAC receptor ion channels. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.31, n.11, p.800-4. 2004.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.26, n.11, p.937-40. 1999.

CHEN, S. R.; EISENACH, J. C.; PAN, H. L. Intrathecal S-nitroso-N-acetylpenicillamine and L-cysteine attenuate nerve injury-induced allodynia through noradrenergic activation in rats. **Neuroscience**, v.101, n.3, p.759-65. 2000.

CHEN, S. R.; KHAN, G. M.; PAN, H. L. Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. **Anesthesiology**, v.95, n.4, p.1007-12. 2001.

CHEN, Y.; MICHAELIS, M.; JANIG, W.; DEVOR, M. Adrenoreceptor subtype mediating sympathetic-sensory coupling in injured sensory neurons. **J Neurophysiol**, v.76, n.6, p.3721-30. 1996.

CHEN, Y. P.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effect of morphine on deep dorsal horn projection neurons depends on spinal GABAergic and glycinergic tone: implications for reduced opioid effect in neuropathic pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v.315, n.2, p.696-703. 2005.

COVEY, W. C.; IGNATOWSKI, T. A.; KNIGHT, P. R.; SPENGLER, R. N. Brain-derived TNFalpha: involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain. **Brain Res**, v.859, n.1, p.113-22. 2000.

COVEY, W. C.; IGNATOWSKI, T. A.; RENAULD, A. E.; KNIGHT, P. R.; NADER, N. D.; SPENGLER, R. N. Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in the brain is increased during persistent pain. **Reg Anesth Pain Med**, v.27, n.4, p.357-66. 2002.

CRAIG, A. D.; DOSTROVSKY, J. O. Medulla to thalamus. In: **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, London: P. D. M. Wall, R., 1999. p.183-214.

CUI, J. G.; O'CONNOR, W. T.; UNGERSTEDT, U.; LINDEROTH, B.; MEYERSON, B. A. Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. **Pain**, v.73, n.1, p.87-95. 1997.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.107, p.660-64. 1992.

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 p. Dissertação

(Mestrado em Ciências) - Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

DALE, C. S.; ALTIER, C.; GIORGI, R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CENAC, N.; ZAMPONI, G. W.; VERGNOLLE, N. Analgesic properties of S100A9 C-terminal domain: a mechanism dependent on calcium channel inhibition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2007. *submetido para publicação*

DALE, C. S.; CENAC, N.; BRITTO, L. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VERGNOLLE, N.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR2). **Br J Pharmacol**, v.149, n.4, p.374-84. 2006a.

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.81-9. 2004.

DALE, C. S.; PAGANO RDE, 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.2794-802. 2006b.

DARLISON, M. G.; PAHAL, I.; THODE, C. Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. **Cell Mol Neurobiol**, v.25, n.3-4, p.607-24. 2005.

DELEO, J. A.; COLBURN, R. W.; RICKMAN, A. J. Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. **Brain Res**, v.759, n.1, p.50-7. 1997.

DESMEULES, J. A.; KAYSER, V.; WEIL-FUGGAZA, J.; BERTRAND, A.; GUILBAUD, G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v.67, n.4, p.941-51. 1995.

DEVOR, M.; GOVRIN-LIPPMANN, R. Axoplasmic transport block reduces ectopic impulse generation in injured peripheral nerves. **Pain**, v.16, n.1, p.73-85. 1983.

DEVOR, M.; SELTZER, Z. Pathophysiology of damage nerves in relation to chronic pain. In: Churchill Livingstone. **Textbook of pain**. London: P. D. Wall; R. Melzack, 1999. p.129-164.

DEVOR, M.; WALL, P. D. Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. **J Neurophysiol**, v.64, n.6, p.1733-46. 1990.

DOUBELL, T. P.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Churchill Livingstone. **Textbook of Pain**. London: P. D. Wall; R. Melzack, 1999. p.165-81.

DOWDALL, T.; ROBINSON, I.; MEERT, T. F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. **Pharmacol Biochem Behav**, v.80, n.1, p.93-108. 2005.

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

_____. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can. J. Physiol. Pharmacology**, v.75, p.704-712. 1997a.

_____. **The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer, 1997b. p. 21-41.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **TIPS**, v.15, p.190-97. 1994.

DWORKIN, R. H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; ALLEN, R. R.; ARGOFF, C. R.; BENNETT, G. J.; BUSHNELL, M. C.; FARRAR, J. T.; GALER, B. S.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; HEWITT, D. J.; LOESER, J. D.; MAX, M. B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K. E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; WATKINS, L. R.; WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v.60, n.11, p.1524-34. 2003.

EATON, M. J.; MARTINEZ, M. A.; KARMALLY, S. A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury. **Brain Res**, v.835, n.2, p.334-9. 1999.

EDGEWORTH, J.; FREEMONT, P.; HOGG, N. Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14. **Nature**, v.342, n.6246, p.189-92. 1989.

ERICHSEN, H. K.; BLACKBURN-MUNRO, G. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain**, v.98, n.1-2, p.151-61. 2002.

EUE, I.; PIETZ, B.; STORCK, J.; KLEMPT, M.; SORG, C. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. **Int Immunol**, v.12, n.11, p.1593-604. 2000.

FELSBY, S.; NIELSEN, J.; ARENDT-NIELSEN, L.; JENSEN, T. S. NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. **Pain**, v.64, n.2, p.283-91. 1996.

FERREIRA, S. H. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores**. Cantabria: Serviço de Publicaciones de la Universidad de Cantabria,, 1994. p. 149-62.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p.1227-31. 1993.

FETZ, E. E. Pyramidal tract effects on interneurons in the cat lumbar dorsal horn. **J Neurophysiol**, v.31, n.1, p.69-80. 1968.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, London: P. D. M. Wall, R., 1999. p.309-29.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci**, v.14, p.219-45. 1991.

FRANEK, M.; VACULIN, S.; ROKYTA, R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. **Physiol Res**, v.53, n.3, p.351-5. 2004.

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

FROMM, G. H. Baclofen as an adjuvant analgesic. **J Pain Symptom Manage**, v.9, n.8, p.500-9. 1994.

GALER, B. S. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. **Neurology**, v.45, n.12 Suppl 9, p.S17-25; discussion S35-6. 1995.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. **Neurosci Lett**, v.372, n.3, p.215-9. 2004.

GEORGE, A.; SCHMIDT, C.; WEISHAUPT, A.; TOYKA, K. V.; SOMMER, C. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. **Exp Neurol**, v.160, n.1, p.124-32. 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. **J Leukoc Biol**, v.64, n.2, p.214-20. 1998.
- GOMES, J. A.; LI, X.; PAN, H. L.; EISENACH, J. C. Intrathecal adenosine interacts with a spinal noradrenergic system to produce antinociception in nerve-injured rats. **Anesthesiology**, v.91, n.4, p.1072-9. 1999.
- GRACEY, R. H.; LYNCH, S. A.; BENNETT, G. J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. **Pain**, v.51, n.2, p.175-94. 1992.
- GRELIK, C.; BENNETT, G. J.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. **Eur J Neurosci**, v.21, n.9, p.2475-87. 2005.
- GRISEL, J. E.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Associative and non-associative mechanisms of morphine analgesic tolerance are neurochemically distinct in the rat spinal cord. **Psychopharmacology (Berl)**, v.128, n.3, p.248-55. 1996.
- GUTIERREZ, V. P. **Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor neuropática e a resposta imune**. 2005. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamaneto de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- HAGBARTH, K. E.; KERR, D. I. Central influences on spinal afferent conduction. **J Neurophysiol**, v.17, n.3, p.295-307. 1954.
- HARATI, Y.; GOOCH, C.; SWENSON, M.; EDELMAN, S.; GREENE, D.; RASKIN, P.; DONOFRIO, P.; CORNBLATH, D.; SACHDEO, R.; SIU, C. O.; KAMIN, M. Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. **Neurology**, v.50, n.6, p.1842-6. 1998.
- HARRIS, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain Res Bull**, v.45, n.1, p.1-8. 1998.
- HESSIAN, P. A.; EDGEWORTH, J.; HOGG, N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. **J Leukoc Biol**, v.53, n.2, p.197-204. 1993.

HESSIAN, P. A.; WILKINSON, L.; HOGG, N. The S100 family protein MRP-14 (S100A9) has homology with the contact domain of high molecular weight kininogen. **FEBS Lett**, v.371, n.3, p.271-5. 1995.

HOGG, N.; ALLEN, C.; EDGEWORTH, J. Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. **Eur J Immunol**, v.19, n.6, p.1053-61. 1989.

IGNATOWSKI, T. A.; COVEY, W. C.; KNIGHT, P. R.; SEVERIN, C. M.; NICKOLA, T. J.; SPENGLER, R. N. Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain. **Brain Res**, v.841, n.1-2, p.70-7. 1999.

IGNATOWSKI, T. A.; NOBLE, B. K.; WRIGHT, J. R.; GORFIEN, J. L.; HEFFNER, R. R.; SPENGLER, R. N. Neuronal-associated tumor necrosis factor (TNF alpha): its role in noradrenergic functioning and modification of its expression following antidepressant drug administration. **J Neuroimmunol**, v.79, n.1, p.84-90. 1997.

IGNATOWSKI, T. A.; NOBLE, B. K.; WRIGHT, J. R.; GORFIEN, J. L.; SPENGLER, R. N. TNFalpha: a neuromodulator in the central nervous system. **Adv Exp Med Biol**, v.402, p.219-24. 1996.

IGNATOWSKI, T. A.; SUD, R.; REYNOLDS, J. L.; KNIGHT, P. R.; SPENGLER, R. N. The dissipation of neuropathic pain paradoxically involves the presence of tumor necrosis factor-alpha (TNF). **Neuropharmacology**, v.48, n.3, p.448-60. 2005.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-10. 2001.

KAWAHARA, H.; SAKAMOTO, A.; TAKEDA, S.; ONODERA, H.; IMAKI, J.; OGAWA, R. A prostaglandin E2 receptor subtype EP1 receptor antagonist (ONO-8711) reduces hyperalgesia, allodynia, and c-fos gene expression in rats with chronic nerve constriction. **Anesth Analg**, v.93, n.4, p.1012-7. 2001.

KEITA, H.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Antinociceptive effect of a kappa-opioid receptor agonist that minimally crosses the blood-brain barrier (ICI 204448) in a rat model of mononeuropathy. **Eur J Pharmacol**, v.277, n.2-3, p.275-80. 1995.

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

KERKHOFF, C.; KLEMP, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochim Biophys Acta**, v.1448, n.2, p.200-11. 1998.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, v.87, n.1, p.3-11. 2001.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v.50, n.3, p.355-63. 1992.

KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? **Prog Neurobiol**, v.74, n.4, p.183-211. 2004.

KO, S. W.; VADAKKAN, K. I.; AO, H.; GALLITANO-MENDEL, A.; WEI, F.; MILBRANDT, J.; ZHUO, M. Selective contribution of Egr1 (zif/268) to persistent inflammatory pain. **J Pain**, v.6, n.1, p.12-20. 2005.

KOMORI, K.; NONAKA, T.; OKADA, A.; KINOH, H.; HAYASHITA-KINOH, H.; YOSHIDA, N.; YANA, I.; SEIKI, M. Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. **FEBS Lett**, v.557, n.1-3, p.125-8. 2004.

KUHAR, M. J.; PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. **Nature**, v.245, n.5426, p.447-50. 1973.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. **Blood**, v.79, n.8, p.1907-15. 1992.

LANTERI-MINET, M.; DE POMMERY, J.; HERDEGEN, T.; WEIL-FUGAZZA, J.; BRAVO, R.; MENETREY, D. Differential time course and spatial expression of Fos, Jun, and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation. **J Comp Neurol**, v.333, n.2, p.223-35. 1993.

LEE, B.; KIM, J.; KIM, S. J.; LEE, H.; CHANG, J. W. Constitutive GABA expression via a recombinant adeno-associated virus consistently attenuates neuropathic pain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.357, n.4, p.971-6. 2007.

LEE, B. H.; WON, R.; BAIK, E. J.; LEE, S. H.; MOON, C. H. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. **Neuroreport**, v.11, n.4, p.657-61. 2000.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**, v.20, n.3, p.315-24. 2005.

LEVINE, J. D.; FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J Neurosci**, v.13, n.6, p.2273-86. 1993.

LEWIS, V. A.; GEBHART, G. F. Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine-specific locus of action and examination of morphine-induced and stimulation-produced analgesia at coincident PAG loci. **Brain Res**, v.124, n.2, p.283-303. 1977.

LIM, J.; LIM, G.; SUNG, B.; WANG, S.; MAO, J. Intrathecal midazolam regulates spinal AMPA receptor expression and function after nerve injury in rats. **Brain Res**, v.1123, n.1, p.80-8. 2006.

LIMMROTH, V.; LEE, W. S.; MOSKOWITZ, M. A. GABAA-receptor-mediated effects of progesterone, its ring-A-reduced metabolites and synthetic neuroactive steroids on neurogenic oedema in the rat meninges. **Br J Pharmacol**, v.117, n.1, p.99-104. 1996.

LOH, L.; NATHAN, P. W. Painful peripheral states and sympathetic blocks. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.41, n.7, p.664-71. 1978.

MA, W.; EISENACH, J. C. Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. **Brain Res**, v.970, n.1-2, p.110-8. 2003.

MALAN, T. P.; MATA, H. P.; PORRECA, F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesiology**, v.96, n.5, p.1161-7. 2002.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol Sci**, v.17, n.12, p.457-62. 1996.

MANITZ, M. P.; HORST, B.; SEELIGER, S.; STREY, A.; SKRYABIN, B. V.; GUNZER, M.; FRINGS, W.; SCHONLAU, F.; ROTH, J.; SORG, C.; NACKEN, W. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface

expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. **Mol Cell Biol**, v.23, n.3, p.1034-43. 2003.

MAO, J.; PRICE, D. D.; MAYER, D. J. Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. **Pain**, v.61, n.3, p.353-64. 1995a.

_____. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. **Pain**, v.62, n.3, p.259-74. 1995b.

MARES, P.; CHINO, M.; KUBOVA, H.; MATHERN, P.; VELIKY, M. Convulsant action of systemically administered glutamate and bicuculline methiodide in immature rats. **Epilepsy Res**, v.42, n.2-3, p.183-9. 2000.

MASON, P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. **Annu Rev Neurosci**, v.24, p.737-77. 2001.

MCLACHLAN, E. M.; JANIG, W.; DEVOR, M.; MICHAELIS, M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v.363, n.6429, p.543-6. 1993.

MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B. Reflex sympathetic dystrophy treated with gabapentin. **Arch Phys Med Rehabil**, v.78, n.1, p.98-105. 1997.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, n.699, p.971-9. 1965.

MIKA, J.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v.415, n.1, p.31-7. 2001.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, n.1, p.1-164. 1999.

MILLIGAN, E. D.; MEHMERT, K. K.; HINDE, J. L.; HARVEY, L. O.; MARTIN, D.; TRACEY, K. J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Res**, v.861, n.1, p.105-16. 2000.

NACHEMSON, A. K.; BENNETT, G. J. Does pain damage spinal cord neurons? Transsynaptic degeneration in rat following a surgical incision. **Neurosci Lett**, v.162, n.1-2, p.78-80. 1993.

NACKEN, W.; ROTH, J.; SORG, C.; KERKHOFF, C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. **Microsc Res Tech**, v.60, n.6, p.569-80. 2003.

NACKEN, W.; SOPALLA, C.; PROPPER, C.; SORG, C.; KERKHOFF, C. Biochemical characterization of the murine S100A9 (MRP14) protein suggests that it is functionally equivalent to its human counterpart despite its low degree of sequence homology. **Eur J Biochem**, v.267, n.2, p.560-5. 2000.

NADESON, R.; GOODCHILD, C. S. Antinociceptive properties of propofol: involvement of spinal cord gamma-aminobutyric acid(A) receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v.282, n.3, p.1181-6. 1997.

NAM, T. S.; YEON, D. S.; LEEM, J. W.; PAIK, K. S. Adrenergic sensitivity of uninjured C-fiber nociceptors in neuropathic rats. **Yonsei Med J**, v.41, n.2, p.252-7. 2000.

NEWTON, R. A.; HOGG, N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. **J Immunol**, v.160, n.3, p.1427-35. 1998.

NUTT, D. GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. **J Clin Sleep Med**, v.2, n.2, p.S7-11. 2006.

OCHS, G. A. Intrathecal baclofen. **Baillieres Clin Neurol**, v.2, n.1, p.73-86. 1993.

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.80-2. 1987.

OHARA, P. T.; VIT, J. P.; JASMIN, L. Cortical modulation of pain. **Cell Mol Life Sci**, v.62, n.1, p.44-52. 2005.

OKAMOTO, K.; MARTIN, D. P.; SCHMELZER, J. D.; MITSUI, Y.; LOW, P. A. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Exp Neurol**, v.169, n.2, p.386-91. 2001.

ONG, J.; KERR, D. I. Clinical potential of GABAB receptor modulators. **CNS Drug Rev**, v.11, n.3, p.317-34. 2005.

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 neuropathic pain. **Journal of Pain**. 2007. *submetido para publicação*

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. 114 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Departamento de Patologia, 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 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v.11, n.4, p.203-10. 2002.

PAGANO, R. L.; MARIANO, M.; GIORGI, R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediate by the protein S100A9. **Mediators Inflamm**, 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. **Inflamm Res**, v.54, n.5, p.204-10. 2005.

PATEL, S.; NAEEM, S.; KESINGLAND, A.; FROESTL, W.; CAPOGNA, M.; URBAN, L.; FOX, A. The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. **Pain**, v.90, n.3, p.217-26. 2001.

PAYNE, B.; NORFLEET, M. A. Chronic pain and the family: a review. **Pain**, v.26, n.1, p.1-22. 1986.

PEDERSEN, L. H.; SCHEEL-KRUGER, J.; BLACKBURN-MUNRO, G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain**, v.127, n.1-2, p.17-26. 2006.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur J Pharmacol**, v.391, n.1-2, p.55-62. 2000.

PORRECA, F.; LAI, J.; BIAN, D.; WEGERT, S.; OSSIPOV, M. H.; EGLEN, R. M.; KASSOTAKIS, L.; NOVAKOVIC, S.; RABERT, D. K.; SANGAMESWARAN, L.; HUNTER, J. C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.14, p.7640-4. 1999.

PORTENOY, R. K. Tolerance to opioid analgesics: clinical aspects. **Cancer Surv**, v.21, p.49-65. 1994.

PROPPER, C.; HUANG, X.; ROTH, J.; SORG, C.; NACKEN, W. Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. **J Biol Chem**, v.274, n.1, p.183-8. 1999.

PRZEWLOCKA, B.; MIKA, J.; LABUZ, D.; TOTH, G.; PRZEWLOCKI, R. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. **Eur J Pharmacol**, v.367, n.2-3, p.189-96. 1999.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur J Pharmacol**, v.429, n.1-3, p.79-91. 2001.

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. **Biochem J**, v.316 (Pt 1), p.285-93. 1996.

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, London: P. D. M. Wall, R., 1999. p.11-57.

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. **J Biol Chem**, v.272, n.14, p.9496-502. 1997.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.111, n.4, p.409-19. 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 485-504.

RASHID, M. H.; UEDA, H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. **Brain Res**, v.953, n.1-2, p.53-62. 2002.

REDDY, S. V.; MADERDRUT, J. L.; YAKSH, T. L. Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. **J Pharmacol Exp Ther**, v.213, n.3, p.525-33. 1980.

REMLER, M. P.; MARCUSSEN, W. H. Bicuculline methiodide in the blood-brain barrier-epileptogen model of epilepsy. **Epilepsia**, v.26, n.1, p.69-73. 1985.

REMLER, M. P.; MARCUSSEN, W. H.; TILLER-BORSICH, J. The late effects of radiation on the blood brain barrier. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v.12, n.11, p.1965-9. 1986.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v.164, n.878, p.444-5. 1969.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v.60, n.6, p.404-15. 2001.

ROBERTS, T. G. Opioids. In: Churchill Livingstone. **Textbook of pain**. London: P. D. Wall; R. Melzack, 1999. p.1187-1214.

ROBERTS, W. J. A hypothesis on the physiological basis for causalgia and related pains. **Pain**, v.24, n.3, p.297-311. 1986.

ROSENFELD, J. P. Interacting brain stem components of opiate-activated, descending, pain-inhibitory systems. **Neurosci Biobehav Rev**, v.18, n.3, p.403-9. 1994.

ROTH, J.; BURWINKEL, F.; VAN DEN BOS, C.; GOEBELER, M.; VOLLMER, E.; SORG, C. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. **Blood**, v.82, n.6, p.1875-83. 1993.

ROWBOTHAM, D. J.; MILLIGAN, K.; MCHUGH, P. Effect of cisapride on morphine absorption after oral administration of sustained-release morphine. **Br J Anaesth**, v.67, n.4, p.421-5. 1991.

SAH, D. W.; OSSIPO, M. H.; PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, n.6, p.460-72. 2003.

SANDKUHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Prog Neurobiol**, v.50, n.1, p.49-81. 1996.

SATO, J.; PERL, E. R. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. **Science**, v.251, n.5001, p.1608-10. 1991.

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.638-43. 1995.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**, v.389, n.4, p.237-43. 2004.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E2. **J. Physiology**, v.403, p.91-104. 1988.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v.43, n.2, p.205-18. 1990.

SENAPATI, A. K.; HUNTINGTON, P. J.; PENG, Y. B. Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. **Brain Res**, v.1036, n.1-2, p.173-9. 2005.

SHAFIZADEH, M.; SEMNANIAN, S.; ZARRINDAST, M. R.; HASHEMI, B. Involvement of GABAB receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. **Gen Pharmacol**, v.28, n.4, p.611-5. 1997.

SHIBATA, F.; MIYAMA, K.; SHINODA, F.; MIZUMOTO, J.; TAKANO, K.; NAKAGAWA, H. Fibroblast growth-stimulating activity of S100A9 (MRP-14). **Eur J Biochem**, v.271, n.11, p.2137-43. 2004.

SLONIMSKI, M.; ABRAM, S. E.; ZUNIGA, R. E. Intrathecal baclofen in pain management. **Reg Anesth Pain Med**, v.29, n.3, p.269-76. 2004.

SMALL, J. R.; SCADDING, J. W.; LANDON, D. N. Ultrastructural localization of sympathetic axons in experimental rat sciatic nerve neuromas. **J Neurocytol**, v.25, n.10, p.573-82. 1996.

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

SNEDECOR, G. W.; SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Statistical methods Biometry**. New York: Owa State University Press, 1946. p. p.859.

SOKAL, D. M.; CHAPMAN, V. Inhibitory effects of spinal baclofen on spinal dorsal horn neurones in inflamed and neuropathic rats in vivo. **Brain Res**, v.987, n.1, p.67-75. 2003.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v.361, n.1-3, p.184-7. 2004.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A.; TOYKA, K. V. A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. **Neurosci Lett**, v.237, n.1, p.45-8. 1997.

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. **Biol Chem**, v.383, n.12, p.1895-905. 2002.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res**, v.897, n.1-2, p.9-19. 2001.

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.763-5. 1990.

STRIZ, I.; TREBICHAUSKY, I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. **Physiol Res**, v.53, n.3, p.245-53. 2004.

SUZUKI, R.; RAHMAN, W.; HUNT, S. P.; DICKENSON, A. H. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. **Brain Res**, v.1019, n.1-2, p.68-76. 2004.

- TAIRA, T.; HORI, T. Clinical application of drug pump for spasticity, pain, and restorative neurosurgery: other clinical applications of intrathecal baclofen. **Acta Neurochir Suppl**, v.87, p.37-8. 2003.
- TAL, M.; BENNETT, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**, v.57, n.3, p.375-82. 1994.
- TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor neuropática. In: Ed. Maio. **Dor: contexto interdisciplinar**. Curitiba: M. J. Teixeira, 2003. p.840.
- TEIXEIRA, M. J.; PIMENTA, C. A. M. Introdução: a evolução do conhecimento. In: Limay. **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: M. J. Teixeira, 1994. p.3-7.
- TREEDE, R. D.; MEYER, R. A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Prog Neurobiol**, v.38, n.4, p.397-421. 1992.
- TSAI, Y. C.; WON, S. J.; LIN, M. T. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. **Pain**, v.88, n.2, p.155-60. 2000.
- URBAN, M. O.; SMITH, D. J. Nuclei within the rostral ventromedial medulla mediating morphine antinociception from the periaqueductal gray. **Brain Res**, v.652, n.1, p.9-16. 1994.
- VAN DEN BOS, C.; ROTH, J.; KOCH, H. G.; HARTMANN, M.; SORG, C. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. **J Immunol**, v.156, n.3, p.1247-54. 1996.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v.46, n.3, p.295-309. 2004.
- WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv Drug Deliv Rev**, v.55, n.8, p.949-65. 2003.
- WATSON, C. P.; BABUL, N. Efficacy of oxycodone in neuropathic pain: a randomized trial in postherpetic neuralgia. **Neurology**, v.50, n.6, p.1837-41. 1998.

-
- WATT, K. W.; BRIGHTMAN, I. L.; GOETZL, E. J. Isolation of two polypeptides comprising the neutrophil-immobilizing factor of human leucocytes. **Immunology**, v.48, n.1, p.79-86. 1983.
- WILLIS, W. D. Mechanical Allodynia. **APS Journal**, v.2, n.1, p.23-33. 1993.
- WILLIS, W. D., JR. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. **Prog Brain Res**, v.77, p.1-29. 1988.
- WOOLF, C. J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, v.306, n.5944, p.686-8. 1983.
- WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v.353, n.9168, p.1959-64. 1999.
- WOOLF, C. J.; WALL, P. D. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. **J Neurosci**, v.6, n.5, p.1433-42. 1986.
- YAKSH, T. L. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. **Pharmacol Biochem Behav**, v.22, n.5, p.845-58. 1985.
- 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.4812-21. 1997.
- YUI, S.; MIKAMI, M.; TSURUMAKI, K.; YAMAZAKI, M. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. **J Leukoc Biol**, v.61, n.1, p.50-7. 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. **J Leukoc Biol**, v.58, n.6, p.650-8. 1995a.
- _____. Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudate cells: its identification as the calcium binding protein complex, calprotectin. **J Leukoc Biol**, v.58, n.3, p.307-16. 1995b.

ZEIGLER, D.; LYNCH, S. A.; MUIR, J.; BENJAMIN, J.; MAX, M. B. Transdermal clonidine versus placebo in painful diabetic neuropathy. **Pain**, v.48, n.3, p.403-8. 1992.

ZIMMER, D. B.; CORNWALL, E. H.; LANDAR, A.; SONG, W. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res Bull**, v.37, n.4, p.417-29. 1995.

ZIMMERMANN, M. Immediate-early genes in the nervous system-are they involved in mechanisms of chronic pain? **Patol Fiziol Eksp Ter**, n.4, p.47-51. 1992.

_____. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v.429, n.1-3, p.23-37. 2001.

ZUREK, J. R.; NADESON, R.; GOODCHILD, C. S. Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. **Pain**, v.90, n.1-2, p.57-63. 2001.

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. **Clin Exp Immunol**, v.72, n.3, p.510-5. 1988.

Anexo

Manuscript Number: JPAIN-D-07-00297

Title: Antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neuropathic pain

Article Type: Laboratory Report

Keywords: Neuropathic pain; S100A9; antinociception; sciatic nerve; chronic constriction injury.

Corresponding Author: Dr Renata Giorgi, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Butantan Institute

First Author: Carina C Paccola, Graduated

Order of Authors: Carina C Paccola, Graduated; Vanessa P Gutierrez, M.D.; Ingrid Longo, M.D.; Luiz Juliano, Ph.D.; Maria A Juliano, Ph.D.; Renata Giorgi, Ph.D.

Abstract: The synthetic peptide identical to the C-terminus of murine S100A9 protein (mS100A9p) has antinociceptive effect on different acute inflammatory pain models. In this study, the effect of mS100A9p was investigated on neuropathic pain induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats. Hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain were assessed to evaluate nociception. These three signs were detected as early as two days after sciatic nerve constriction and lasted for over 14 days after CCI. Rats were treated with different doses of mS100A9p by intraplantar, oral, or intrathecal routes on day 14 after CCI, and nociception was evaluated 1 h later. These three routes of administration blocked hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain. The duration of the effect of mS100A9p depends on the route used and phenomenon analyzed. Moreover, intraplantar injection of mS100A9p in the contralateral paw inhibited the hyperalgesia on day 14 days after CCI.

Antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neuropathic pain

Carina Cicconi Paccola,* Vanessa Pacciari Gutierrez,* Ingrid Longo,* Luiz Juliano[†],
Maria Aparecida Juliano[†], and Renata Giorgi*

**Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, Sao Paulo, Brazil*

[†]Department of Biophysics, Pharmacology Institute, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author: Dr. Renata Giorgi, Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brasil. Tel.: +55-11-37267222, R.2163; fax: +55-11-37261505. E-mail: regiorgi@yahoo.com

Running title: C-terminus of S100A9 inhibits neuropathic pain

Abstract: The synthetic peptide identical to the C-terminus of murine S100A9 protein (mS100A9p) has antinociceptive effect on different acute inflammatory pain models. In this study, the effect of mS100A9p was investigated on neuropathic pain induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats. Hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain were assessed to evaluate nociception. These three signs were detected as early as two days after sciatic nerve constriction and lasted for over 14 days after CCI. Rats were treated with different doses of mS100A9p by intraplantar, oral, or intrathecal routes on day 14 after CCI, and nociception was evaluated 1 h later. These three routes of administration blocked hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain. The duration of the effect of mS100A9p depends on the route used and phenomenon analyzed. Moreover, intraplantar injection of mS100A9p in the contralateral paw inhibited the hyperalgesia on day 14 days after CCI.

Perspective: The results obtained herein demonstrate the antinociceptive effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neuropathic pain, suggesting a potential therapeutic use for it in persistent pain syndromes.

Key words: *Neuropathic pain; S100A9; antinociception; sciatic nerve; chronic constriction injury.*

Introduction

Chronic neuropathic pain is caused by disorders or injuries to the nervous system. Patients commonly manifest hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain,^{14,39,43} which can interfere in their quality of life.^{7,16} Neuropathic pain has been reported to be caused by sustained activation of peripheral nociceptors, leading to hypersensitivity of primary afferent neurons, as well as to central sensitization of dorsal horn neurons.⁴⁹ A variety of therapeutic approaches – such as the administration of opioid analgesics, tricyclic antidepressants, anticonvulsants, gabapentin, local anesthetics, as well as non pharmacological treatments like acupuncture and electrical stimulation – have been used to treat neuropathic pain.⁷ Nevertheless, they are not completely effective to relieve neuropathic pain, and novel modalities of treatment and drugs are thereby necessary to be investigated.^{7,16} Animal models of peripheral nerve injury are useful to elucidate the mechanisms underlying neuropathic pain,¹⁵ and to make improvements to current clinical treatments.² The chronic constriction injury (CCI), an animal model of neuropathic pain proposed by Bennett and Xie,⁴ produces pronounced behavioral responses and it can reproduce signs noticed in humans, contributing thereby to advance the understanding of neural mechanisms in neuropathic pain disorders.¹⁵

Aiming to discover new tools that can modulate pain responses, our group has studied the effect of S100A9 protein on different pain models. The calcium-binding proteins S100A8 (MRP-8) and S100A9 (MRP-14) were isolated, sequenced, and their genes cloned in an attempt to characterize the migration inhibitory factor; which accounts for their initial denomination as migration inhibitory factor-related proteins – MRP.^{24,35}

They belong to the S100 protein family,^{26,29} and form a complex called calprotectin.⁴⁰ The expression of these proteins is restricted to circulating granulocytes and monocytes,⁵² representing approximately 45 and 1% of the soluble cytosolic content of these cells, respectively.^{17,24} Calprotectin has been demonstrated to exhibit different pathophysiological responses, such as anti-inflammatory effects on a model of adjuvant-induced arthritis in rats,⁵ modulation of fibroblast growth, and induction of apoptosis in normal fibroblasts and tumor cells.^{50,51} S100A8/A9 protein complex specifically binds fatty acids in a calcium-dependent manner.^{28,44} Thus, increased calprotectin levels have been reported in body fluids of patients with acute and chronic diseases, making it useful as a diagnostic marker of inflammation.⁴⁶ S100A9 has also been reported to regulate leukocyte trafficking^{18,34} and to deactivate activated peritoneal macrophages.¹ Accordingly, previous investigations undertaken by our group demonstrated that S100A9 exhibited a potent antinociceptive activity in inflammatory pain models, either when S100A9 was directly injected into the peritoneal cavity²⁰ or when it was secreted by neutrophils in acute inflammatory peritonitis induced by glycogen or carrageenan in mice.^{20,36,37}

The C-terminal portion of human S100A9 is identical to the N-terminus of neutrophil immobilizing factor (NIF),^{19,48} and besides it has a high homology with domain five of high molecular weight kininogen.²⁵ This portion is involved with zinc- and arachidonic acid binding.^{10,30,45} A synthetic peptide identical to the C-terminus of murine S100A9 protein (mS100A9p) has been studied in our laboratory. This peptide inhibits hyperalgesia and edema induced by the metalloproteinase jararhagin.¹² In addition, mS100A9p induces antinociception in diverse acute inflammatory models of

nociception¹³ as well as in the hyperalgesia evoked by PAR₂ (protease activated receptor type 2) activation.¹¹ Furthermore, mS100A9p inhibits the spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells in mice.³⁸

Taking into consideration both the complex therapeutic control of neuropathic pain and the antinociceptive effect of the C-terminal portion of murine S100A9 on acute inflammatory pain models, the aim of this study was to evaluate the effect of mS100A9p on chronic pain. Our results demonstrate that the C-terminus of S100A9 shows an antinociceptive effect on experimental neuropathic pain, demonstrating its therapeutic potential to treat persistent pain syndromes.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 180-200g were used throughout this study. Animals were maintained under controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light/dark cycle (12/12 hours) with free access to water and food. Rats were housed in an animal care facility and taken to the testing room at least two days before the experiment. Behavioral tests were performed between 9:00 and 16:00 h. All procedures were in accordance with the guidelines for animal experimentation, and the protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee at Butantan Institute (CEUAIB, protocol numbers 136/2003 and 206/05).

Synthesis of the Peptide

The peptide H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G (H92-G110), identical to the C-terminus of murine S100A9 protein (mS100A9p), was synthesized based on the sequence published previously.⁴¹ This peptide was synthesized in solid phase by the Fmoc technique. The characterization and purification of the peptide was carried out by HPLC, and its mass evaluated by MALDI-TOF spectrometry. The peptide was diluted in 0.01M HCl at a final concentration of 1 mg/ml.

Chronic Constriction Injury (CCI) of the Sciatic Nerve

Rats were anesthetized with halothane, and the surgical procedure was carried out according to Bennett and Xie.⁴ The right sciatic nerve was exposed at the level of the middle of the thigh. The nerve was freed of adhering tissue and 4 ligatures (4.0 chromic gut) were tied loosely around it with about 1 mm spacing, and the incision was closed in layers. Controls were sham operated by exposing the sciatic nerve without inducing any lesion or ligation. All surgical procedures were performed by the same researcher.

Nociception Evaluation

Mechanical Hyperalgesia (Paw Pressure Test)

Pain threshold was measured using an analgesy-meter (Ugo Basile®, Comerio, Italy), as described elsewhere.⁴² The pressure apparatus was used to assess pressure pain thresholds prior to and after CCI at different times. Briefly, a force with increasing magnitude (16 g/s) was applied to the hind paw. When animals reacted by withdrawing the paw, the force (in grams) needed to induce this response represented the pain

threshold. To reduce stress, rats were habituated to the testing procedure the day before the experiment.

Mechanical Allodynia (von Frey Test)

Mechanical allodynia was evaluated by the von Frey test⁹ applied to the right hind paw as described by Milligan et al.^{31,32} The von Frey test was used to assess low-threshold mechanical sensibility prior to and after CCI surgery. Rats were individually placed in plastic cages with wire floor to access the paws. After an adaptation period of 40 min during two days preceding the day of test, a logarithmic series of 10 calibrated Semmes-Weinstein monofilaments (von Frey hairs, Stoelting, Wood Dale, IL, USA) was applied, one by one, perpendicularly, to the plantar surface of the hind paw to determine the stimulus intensity threshold stiffness required to elicit a paw withdrawal response. Log stiffness of the hairs is determined by $\log_{10}$ (milligrams $\times$ 10) and ranged from 3.61 (0.4 g) to 5.18 (15 g). The behavioral responses were used to calculate the 50% paw withdrawal threshold (absolute threshold), by fitting a Gaussian integral psychometric function using a maximum-likelihood fitting method, which allows parametric analyses.^{23,31-33,47}

Spontaneous Pain

Signs of spontaneous pain were observed prior to and after CCI surgery. Rats were placed on a glass floor at room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and, after an acclimation period of 30 min, they were observed for 10 min. The cumulative duration of the lifting

and licking of the right hind limb was measured. The lifting and licking of the paw as a part of grooming behavior was not taken into consideration.

Intrathecal Injection

Rats were anesthetized with halothane and the spinal column was arched. Lumbar puncture was conducted based on previous reports.^{8,22} Briefly, a sterile 23-gauge needle was attached to a 50- μ l Hamilton syringe, and the needle was inserted between lumbar vertebrae L5 and L6. Immediately upon insertion, a characteristic tail flick was observed, indicating subarachnoid entry.

Statistical Analyses

Data from the von Frey test were analyzed as the interpolated 50% threshold (absolute threshold) in log base 10 of stimulus intensity (monofilament stiffness in milligrams $\times$ 10). Results were presented as mean $\pm$ SEM. Two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was used to detect statistically significant differences, followed by Tukey contrast analysis at $P < 0.05$.²⁷ Data were analyzed with the use of SigmaStat 3.1 software.

Results

Effect of the Chronic Constriction Injury on Nociception

To induce experimental neuropathic pain, rats were submitted to CCI and evaluated by the paw pressure test, von Frey test, and spontaneous pain behavior prior to the surgery, and after 2, 7 and 14 days. Sham-operated animals were evaluated as

controls. The surgical procedure caused hyperalgesia (Fig 1A), allodynia (Fig 1B), and spontaneous pain (Fig 1C) at all time intervals analyzed. CCI rats had a decrease in the withdrawal response on the paw pressure test on days 2 and 7 (49%), and on day 14 (56%). For the von Frey test, the decreases were of 15% on day 2, and 18% on days 7 and 14. Besides, signs of spontaneous pain were noticed on days 2, 7, and 14 after CCI. Thus, the day 14 was henceforth used for comparison in other experiments. Sham-operated rats did not show these three signs of neuropathic pain at any time. These findings are in agreement with data obtained previously.^{4,15}

Evaluation of mS100A9p Treatment by Different Routes on Neuropathic Pain

To investigate the effect of the C-terminus of murine S100A9 on experimental neuropathic pain, CCI rats on day 14 after surgery were treated with this peptide by intraplantar, oral or intrathecal routes. Doses of 1, 4 or 8 µg/animal were used for intraplantar and oral routes, and doses of 0.1, 0.5 or 1 µg/animal for the intrathecal route. Both CCI rats treated with vehicle (saline plus 0.01M HCl) and sham-operated rats treated with mS100A9p or vehicle were used as controls. One hour after treatments, the paw pressure and von Frey tests were applied. mS100A9p administered by intraplantar (Fig 2) and oral (Fig 3) routes at the dose of 8 µg/animal completely reversed hyperalgesia (A) and allodynia (B) induced by CCI. The doses of 0.5 or 1 µg/animal could completely block both phenomena by i.t. route (Fig 4). The doses that reversed hyperalgesia and allodynia by each route were used in subsequent protocols. Thus, the dose of 8 µg/animal was used for intraplantar and oral administration, and 0.5 µg/animal

for intrathecal administration. Responses of sham-operated rats were identical to their baseline responses after the surgical procedure, and did not vary over treatments (data not showed).

The effect of mS100A9p on spontaneous pain was evaluated 1 h after treatments on day 14 after surgery; CCI rats treated with vehicle were evaluated as controls. Treatments with mS100A9p by intraplantar (Fig 5A), oral (Fig 5B), or intrathecal (Fig 5C) route reversed the signs of spontaneous pain in CCI rats. In regard to controls, CCI rats treated with vehicle did not present any modification of their previous status of hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain.

Time Course of mS100A9p on Neuropathic Pain

To evaluate the time course of mS100A9p on hyperalgesia and allodynia on day 14 after CCI, the paw pressure and von Frey tests were applied prior to and at different times after treatments with the peptide or vehicle. The intraplantar treatment with mS100A9p (8 µg/animal) inhibited hyperalgesia for 5 h after injection (Fig 6A), while allodynia of CCI rats could be reversed for 3 h (Fig 6B). Besides, oral administration of mS100A9p (8 µg/animal) reversed hyperalgesia for 5 h (Fig 6C). On the other hand, allodynia could be inhibited by mS100A9p only for 1 h (Fig 6D). Additionally, intrathecal administration of mS100A9p (0.5 µg/animal) totally reversed hyperalgesia (Fig 6E) and allodynia (Fig 6F) at 1 h, but its relieving effects were no more noticed after 3 h.

Systemic Effects of mS100A9p on CCI Model

To determine whether the intraplantar injection of mS100A9p elicited a local or systemic effect, the left hind paw (contralateral to CCI) was injected with the same dose used previously in the right hind paw (ipsilateral to CCI). mS100A9p could inhibit both hyperalgesia (Fig 7A) and allodynia (Fig 7B) of the right hind paw, even when injected in the contralateral paw.

Discussion

We have demonstrated the antinociceptive effect of the calcium-binding protein S100A9 on experimental inflammatory pain.^{20,36,37} Such antinociceptive activity is also observed for the C-terminus of murine S100A9 (mS100A9p) using different models of acute inflammatory pain.¹¹⁻¹³ Taking into consideration that neuropathic pain results from peripheral nerve injury and is a type of chronic pain difficult to be treated, in the present study we addressed the likely antinociceptive effect of mS100A9p on neuropathic pain produced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, an experimental model proposed by Bennet and Xie.⁴ In fact, injury to peripheral nerves commonly provokes persistent or chronic neuropathic pain in humans patients, which is manifested by hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain.^{14,39,43} Likewise, CCI causes hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain,⁴ thereby reproducing the signs manifested by patients. Previous data obtained in our laboratory had demonstrated the presence of these nociceptive signs as early as one day after CCI, and lasted for over 14 days after the surgical procedure, according to data reported by Bennet and Xie.⁴

CCI is considered a well-established model of peripheral nerve injury.^{15,21} Besides, CCI has been demonstrated to produce the most sustained and greatest responses in six different behavioral tests¹⁵ when compared with other four models of peripheral nerve injury. In the same study, one animal in each group had to be euthanized after CCI because of autotomy,¹⁵ but under our experimental conditions less than one animal in each group developed autotomy. These animals were not used in our experimental protocols.

Our data demonstrated that mS100A9p completely inhibited hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain on day 14 after CCI. This effect was observed when the peptide was administered by intraplantar, oral, and intrathecal routes. However, the doses necessary to suppress the neuropathic pain of CCI rats were lower when mS100A9p was administered by the intrathecal route (0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{animal}$) than by intraplantar and oral routes (8 $\mu\text{g}/\text{animal}$). Besides, the dose of mS100A9p injected intraplantarly to reverse hyperalgesia of neuropathic pain was higher than the dose used to inhibit acute inflammatory hyperalgesia induced by carrageenan (1 $\mu\text{g}/\text{animal}$).¹³ This observation is likely due to the complex mechanisms involved in neuropathic pain, leading to degeneration of A-fibers and most C-fibers,^{3,6} as well as to central sensitization.⁴³ Compared with acute pain processes, the complexity of chronic mechanisms likely requires higher doses of mS100A9p to block nociception in this model.

Intraplantar injection was used here to characterize the local effect of mS100A9p. However, even when it was injected intraplantarly in the contralateral paw, the antinociceptive effect of mS100A9p was maintained, suggesting a systemic action of mS100A9p on nociceptive control. Moreover, oral administration of mS100A9p blocked

the signs of neuropathic pain, demonstrating that mS100A9p possess a systemic action, which is not influenced by gastric digestion. On the other hand, besides the peripheral activity, mS100A9p possess antinociceptive effect via a central action, once it inhibited nociceptive behavior when injected intrathecally. It is likely that mS100A9p can cross the blood-brain barrier and interfere with central transmission of nociceptive input. This hypothesis is currently under investigation.

Many pathophysiological disorders associated with central sensitization in the presence of peripheral nerve injury contribute to the development of spontaneous pain, allodynia and hyperalgesia during neuropathic pain.^{14,43} Since mS100A9p inhibited three signs that characterize neuropathic pain in the model used herein, the C-terminus of murine S100A9 may be suggested to interfere with mechanisms involved in CCI-induced chronic pain, even after the development of central alterations. The antinociceptive effect of mS100A9p has a rapid onset by three diverse routes, initiating 1 h after its administration. The duration of antinociception induced by mS100A9p is variable and depends on the route used. Intrathecal administration evokes short reversion of hyperalgesia and allodynia, while intraplantar administration produces a long-lasting inhibition of both phenomena. Oral administration of mS100A9p produced an effect that lasted longer on hyperalgesia than on allodynia. These findings suggest that the mechanisms which caused antinociception were different and depended on the route used, and/or that there are differences in the metabolism of mS100A9p depending on the route used. Thus, the mechanisms responsible for the development of hyperalgesia and allodynia are diverse,⁷ explaining the differences noticed between the time courses of each phenomenon.

In conclusion, our findings demonstrate that the C-terminus of murine S100A9 protein inhibits experimental neuropathic pain by mechanisms which are still under investigation. Overall, taking into consideration our previous findings reporting the use of mS100A9p to inhibit nociception in acute inflammatory pain models ¹¹⁻¹³, and the data reported here, we suggest that mS100A9p has a therapeutic potential to control acute and persistent pain.

Acknowledgments

This study was part of the Master Dissertation of Carina C. Paccola, presented to the Area of Experimental and Comparative Pathology at the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Brazil. We are indebted to Dr. Marcelo L. Santoro from Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, and Dr. Rosana L. Pagano from Laboratory of Cellular Neurobiology, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo for critical review of the manuscript. Supported by PIBIC/CNPq, FAPESP, and Fundação Butantan.

References

1. 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. *J Leukoc Biol* 62:852-858, 1997.
2. Backonja MM, Galer BS: Pain assessment and evaluation of patients who have neuropathic pain. *Neurol Clin* 16:775-790, 1998.
3. Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G: The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 47:359-367, 1991.
4. Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107, 1988.
5. Brun JG, Haland G, Haga HJ, Fagerhol MK, Jonsson R: Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. *Apmis* 103:233-240, 1995.
6. Carlton SM, Dougherty PM, Pover CM, Coggeshall RE: Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 131:88-92, 1991.
7. Caviedes BE, Herranz JL: [Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain]. *Rev Neurol* 35:1037-1048, 2002.

8. Chacur M, Milligan ED, Sloan EM, Wieseler-Frank J, Barrientos RM, Martin D, Poole S, Lomonte B, Gutierrez JM, Maier SF, Cury Y, Watkins LR: Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain* 108:180-191, 2004.
9. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63, 1994.
10. Clohessy PA, Golden BE: His-X-X-X-His motif in S100 protein, calprotectin: relation to microbistatic activity. *J Leukoc Biol* 60:674, 1996.
11. Dale CS, Cenac N, Britto LR, Juliano MA, Juliano L, Vergnolle N, Giorgi R: The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR2). *Br J Pharmacol* 149:374-384, 2006.
12. Dale CS, Goncalves LR, Juliano L, Juliano MA, da Silva AM, Giorgi R: The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. *Peptides* 25:81-89, 2004.
13. Dale CS, Pagano Rde L, Paccola CC, Pinotti-Guirao T, Juliano MA, Juliano L, Giorgi R: Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. *Peptides* 27:2794-2802, 2006.
14. Devor M, Wall PD: Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. *J Neurophysiol* 64:1733-1746, 1990.

15. Dowdall T, Robinson I, Meert TF: Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80:93-108, 2005.
16. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM: Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 60:1524-1534, 2003.
17. Edgeworth J, Freemont P, Hogg N: Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14. *Nature* 342:189-192, 1989.
18. Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C: Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int Immunol* 12:1593-1604, 2000.
19. Freemont P, Hogg N, Edgeworth J: Sequence identity. *Nature* 339:516, 1989.
20. Giorgi R, Pagano RL, Dias MA, 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. *J Leukoc Biol* 64:214-220, 1998.
21. Grelik C, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A: Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* 21:2475-2487, 2005.

22. Grisel JE, Watkins LR, Maier SF: Associative and non-associative mechanisms of morphine analgesic tolerance are neurochemically distinct in the rat spinal cord. *Psychopharmacology (Berl)* 128:248-255, 1996.
23. Harvey LO: Efficient estimation of sensory thresholds. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers* 18:623-632, 1986.
24. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N: MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* 53:197-204, 1993.
25. Hessian PA, Wilkinson L, Hogg N: The S100 family protein MRP-14 (S100A9) has homology with the contact domain of high molecular weight kininogen. *FEBS Lett* 371:271-275, 1995.
26. Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C: Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta* 1448:200-211, 1998.
27. Kleinbaun DG, Kupper LL, Muller KE, Nizam A. Analysis of repeated measures data. In: Company BCP, ed. *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods*. New York, NY, 1998: 589-638.
28. Klempt M, Melkonyan H, Nacken W, Wiesmann D, Holtkemper U, Sorg C: The heterodimer of the Ca²⁺-binding proteins MRP8 and MRP14 binds to arachidonic acid. *FEBS Lett* 408:81-84, 1997.
29. Kligman D, Hilt DC: The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13:437-443, 1988.

30. Loomans HJ, Hahn BL, Li QQ, Phadnis SH, Sohnle PG: Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. *J Infect Dis* 177:812-814, 1998.
31. Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR: Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861:105-116, 2000.
32. Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR: Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 21:2808-2819, 2001.
33. Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR: Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *Journal of Neuroscience* 23:1026-1040, 2003.
34. Newton RA, Hogg N: The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 160:1427-1435, 1998.
35. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C: Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330:80-82, 1987.
36. Pagano RL, Dias MA, Dale CS, Giorgi R: Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators Inflamm* 11:203-210, 2002.

37. Pagano RL, Mariano M, Giorgi R: Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediated by the protein S100A9. *Mediators Inflamm* 2006:36765, 2006.
38. Pagano RL, Sampaio SC, Juliano L, Juliano MA, Giorgi R: The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells. *Inflamm Res* 54:204-210, 2005.
39. Payne B, Norfleet MA: Chronic pain and the family: a review. *Pain* 26:1-22, 1986.
40. Propper C, Huang X, Roth J, Sorg C, Nacken W: Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem* 274:183-188, 1999.
41. Raftery MJ, Harrison CA, Alewood P, Jones A, Geczy CL: 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. *Biochem J* 316 (Pt 1):285-293, 1996.
42. Randall LO, Selitto JJ: A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111:409-419, 1957.
43. Schaible HG, Richter F: Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg* 389:237-243, 2004.
44. Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, Hagens G: A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8)

and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* 272:9371-9377, 1997.

45. 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. *Biol Chem* 383:1895-1905, 2002.

46. Striz I, Trebichavsky I: Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 53:245-253, 2004.

47. Treutwein B, Strasburger H: Fitting the psychometric function. *Percept Psychophys* 61:87-106, 1999.

48. Watt KW, Brightman IL, Goetzl EJ: Isolation of two polypeptides comprising the neutrophil-immobilizing factor of human leucocytes. *Immunology* 48:79-86, 1983.

49. Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964, 1999.

50. Yui S, Mikami M, Tsurumaki K, Yamazaki M: Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *J Leukoc Biol* 61:50-57, 1997.

51. 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. *J Leukoc Biol* 58:650-658, 1995.

52. 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. *Clin Exp Immunol* 72:510-515, 1988.

Figure 1. Effect of chronic constriction injury on hyperalgesia (A), allodynia (B), and spontaneous pain (C). Rats were assessed prior to CCI (baseline, day 0) and after 2, 7 and 14 days (■ and ♦). Sham-operated rats were evaluated as controls (▲ and *). Each point represents mean $\pm$ SEM of 5 to 7 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$). #significantly different from mean values of sham-operated animals ($p < 0.0001$).

Figure 2. Effect of mS100A9p administered by intraplantar route on hyperalgesia (A) and allodynia (B) of rats evaluated by the paw pressure and von Frey tests, respectively. Rats were assessed before CCI (baseline) and 14 days later, both prior to treatments and after 1 h. mS00A9p was injected in three different doses (1, 4, or 8 $\mu\text{g/paw}$), and vehicle (saline + 0.01M HCl) was used as control. Each point represents mean $\pm$ SEM of 6 to 7 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure 3. Effect of mS100A9p administered by oral route on hyperalgesia (A) and allodynia (B) of rats evaluated by the paw pressure and von Frey tests, respectively. Rats were assessed before CCI (baseline) and 14 days later, both prior to treatments and after 1 h. mS00A9p was administered in three different doses (1, 4, or 8 $\mu\text{g/animal}$), and vehicle (saline + 0.01M HCl) was used as control. Each point represents mean $\pm$ SEM of 5 to 7 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure 4. Effect of mS100A9p administered by intrathecal route on hyperalgesia (A) and allodynia (B) of rats evaluated by the paw pressure and von Frey tests, respectively. Rats

were assessed before CCI (baseline) and 14 days later, both prior to treatments and after 1 h. mS00A9p was injected in three different doses (0.1, 0.5, or 1 $\mu\text{g}/\text{animal}$), and vehicle (saline + 0.01M HCl) was used as control. Each point represents mean $\pm$ SEM of 6 to 8 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure 5. Effect of mS100A9p administered by intraplantar (A), oral (B) or intrathecal (C) route on spontaneous pain of rats. Rats were assessed 14 days post-CCI and 1 h after treatments with mS100A9p (8 $\mu\text{g}/\text{animal}$ i.pl. or p.o., and 0.5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ i.t.). Vehicle (saline + 0.01M HCl) was used as control. Each point represents mean $\pm$ SEM of 5 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure 6. Time course of intraplantar (A and B), oral (C and D), or intrathecal (E and F) administration of mS100A9p on hyperalgesia (A; C; E) and allodynia (B; D; F) of rats submitted to CCI and evaluated by the paw pressure and von Frey tests, respectively. Animals were assessed before CCI (baseline) and 14 days later, both prior to and after treatments at different times. Rats were treated with mS100A9p (8 $\mu\text{g}/\text{animal}$ i.pl. or p.o., and 0.5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ i.t.) or vehicle (saline + 0.01M HCl). Each point represents mean $\pm$ SEM of 6 to 8 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure 7. Effect of intraplantar injection of mS100A9p (8 $\mu\text{g}/\text{paw}$) in the contralateral side of CCI on hyperalgesia (A) and allodynia (B) evaluated by the paw pressure and von Frey tests, respectively. Rats were assessed before CCI (baseline) and 14 days later, both

prior to treatments and after 1 h. Rats treated with vehicle (saline + 0.01M HCl) were evaluated as controls. Each point represents mean $\pm$ SEM of 7 to 8 rats. *significantly different from mean values of baseline measures ($p < 0.0001$).

Figure

Figure