**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

ALEXANDRE HASHIMOTO PEREIRA LOPES

**Investigação da participação do inflamassoma na
gênese da dor inflamatória**

RIBEIRÃO PRETO

2013

ALEXANDRE HASHIMOTO PEREIRA LOPES

**Investigação da participação do inflamassoma na
gênese da dor inflamatória**

Versão corrigida de acordo com a Resolução CoPGr Nº 6018.

O documento original encontra-se disponível na FMRP.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar
Cunha

RIBEIRÃO PRETO

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Alexandre Hashimoto Pereira

Investigação da participação do inflamassoma na gênese da dor inflamatória.

Ribeirão Preto, 2013.
113 p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Palavra chave: Carragenina, Dor inflamatória, Inflamassoma, IL-1 β , Caspase-1, NLRC4, NLRP3, ASC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alexandre Hashimoto Pereira Lopes

Investigação da participação do inflamassoma na gênese da dor inflamatória.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 20 de Fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Juliano Ferreira

Instituição: UFSM - RS

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe Denise Maria Contatto pelo carinho e, amor incondicional sem medir esforços sempre apoiou meus sonhos e minhas lutas diárias, em todos os momentos irrestritos na minha trajetória. Ao meu amado pai, João Pereira Lopes, exemplo de atitude, garra, sabedoria e pela torcida em todos os momentos adversos. Obrigado por me ensinarem os valores da vida!

Aos meus queridos irmãos Débora, Eduardo, Mateus e Giuliane pela torcida, amizade e pensamento positivo, por entenderem a minha ausência em alguns momentos. Vocês são a melhor ponte com meu passado e quem vai sempre mesmo me apoiar no futuro.

*Por acreditarem nos meus sonhos
Amo Vocês !!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por proteger e guiar meu caminho, proporcionando muitos desafios para meu crescimento e evolução. Principalmente, obrigado pela minha saúde.

À minha família, que mesmo distante de alguma forma sempre esteve presente, me apoiando e incentivando em todas as fases da minha vida. Agradeço em especial ao meu avô, Sr. Atílio Contatto que incondicionalmente sempre abençoou e iluminou o meu caminho e nossa Família.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pela orientação, incentivo e confiança, principalmente pela autonomia que me cedeu para que eu realizasse de forma exemplar todo esse trabalho. Obrigado pela oportunidade de estar em um grande centro de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pelo apoio e competência científica, sem dúvida um exemplo profissional. Obrigado por ceder seu laboratório e permitir que eu desenvolva meu aprendizado e amadurecimento científico.

Aos Profs. Dr. Dario Simões Zamboni e Dr. Juliano Ferreira pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente com atenção, somando as discussões deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira, por gentilmente ceder seu laboratório e proporcionar condições para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Bernhard Ryffel pela oportunidade ímpar de estar em um grande centro de pesquisa, pelos ensinamentos de vida e científico, amizade e possibilidade de avançar nesse estudo, ao ceder animais knockout. Principalmente obrigado por todo apoio da equipe CNRS-França.

À Profa. Dr. Isabelle Couillin pelas inúmeras discussões e contribuições científicas no desenvolvimento final desse trabalho.

À Katinha, pelos incentivos durante essa jornada. Obrigado por fazer parte desse momento tão importante em minha vida.

Aos grandes amigos que diretamente participaram e contribuíram com esse trabalho e com discussões científicas: Jhimmy Talbot, Rangel Leal, Rafael França.

Ao grande amigo e companheiro de jornada Fabrício Oliveira Souto, obrigado pela força e torcida.

Ao querido amigo Guilherme Rabelo pelos ensinamentos, pela força nessa caminhada e os momentos de amizade sincera.

À Querida amiga, Larissa Garcia pela amizade sincera e incondicional, muito importante para poder superar todos os desafios, por todo auxílio e desenvolvimento do trabalho.

À minha querida amiga Giuliana Bertozzi Francisco, muito obrigado por sua ajuda em vários experimentos e principalmente por seu enorme carinho e paciência.

À Ieda Regina dos Santos Schivo, por sua ajuda e pela amizade.

À Diva Amábil de Sousa pela convivência, pelo carinho e amizade.

Ao meu amigo, Sergio Rosa, por sua ajuda e organização em todos os momentos, mas principalmente por sua amizade. Muito obrigado.

A todas as pessoas que compõem o laboratório de dor e inflamação que indiretamente contribuíram para esse trabalho e as horas de amizade: Adriana, Andressa, Daniela Nascimento, Daniel, Fabiane, Fernanda, Paulo Henrique, Jozi, Alexandre Kanashiro, Paulinha, Rafael Sanches, Prof Zeca, Mirian, Flávia, Andressa Duarte, David Ferreira, Andreza Urba, Cristina, Morena Brazil, Flávio Protássio, Gabriela, Paula Barbin, Jackeline, Rafael Poloni, Giovanna Galdino, Walter, Vanessa, André Saraiva, Sílvia Cellone.

Aos amigos do DOL, pelas produtivas discussões, mas também pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da pelo convívio.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Soninha, Fátima, Acácio e Ramon pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativa. Obrigado pelo nosso maravilhoso convívio.

Aos bioteristas, Julio, Maria Inês e Eliana pelo cuidado com os animais do biotério, tão importantes para nosso trabalho, e principalmente pelo carinho comigo.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência, dedicação e também pelo convívio.

A CAPES pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

“O mundo se afasta e dá passagem para o Homem que sabe aonde vai”
David Starr Jordan

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

° – graus
α – alfa
β – beta
μg – micrograma
μL – microlitro
Δ – delta
AA-ácido araquidônico
AINES – antiinflamatórios não esteroidais
Anova – análise de variância
ANVISA- agência nacional de vigilância sanitária
ASC - (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain)
RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro
CXCL8- Chemokine (CXC-motif) ligand 8
C – Celsius
Ca²⁺ – íons cálcio
CIAS1(cold induced autoinflammatory syndrome 1)
Cg – carragenina
cm – centímetro
COX – ciclooxigenase
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EPM – erro padrão da média
Y- gama
g – grama
GRAS (Generally Regarded as Safe)
h – hora
IASP – International Association for Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da dor)
i.pl- Intraplantar
IL-1β – interleucina 1beta
IPAF/NLRC4-(IL-1β- converting enzyme Protease-Activating Factor)
IL-6 – interleucina 6
IL-8 – interleucina 8
i.p. – intraperitoneal
LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*
LT – leucotrieno
LTB₄ – leucotrieno do tipo B 4
MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos
mL – mililitro
mg – miligrama
mm – milímetro
ng – nanograma
NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)
PG – prostaglandina
PGE₂ – prostaglandina do tipo E2
PLC – fosfolipase C
RPM – rotação por minuto

RT – transcriptase reversa

s – segundo

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

V – volt

RESUMO

LOPES, A. H. P. **Investigação da participação do inflamassoma na gênese da dor inflamatória.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2013.

A hiperalgesia inflamatória é o processo pelo qual ocorre a sensibilização dos neurônios nociceptores aferentes primários por mediadores químicos inflamatórios, gerando assim uma diminuição do limiar nociceptivo e como consequência episódios de dor. Entre os principais mediadores envolvidos com a sensibilização das fibras nociceptivas periféricas está a prostaglandina E2 (PGE2), que é liberada como um produto final de uma cascata de mediadores inflamatórios. Dentro desta cascata de liberação hierárquica podemos destacar a interleucina -1 β (IL)-1 β , uma citocina importante na gênese da dor inflamatória, devido à sua capacidade de induzir a produção da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), e consequentemente PGE2. O mecanismo de controle da produção da IL-1 β envolvem dois passos intracelulares: a indução da expressão de uma forma protéica inativa (a pró-IL-1 β) e a geração da forma biologicamente ativa (IL-1 β) a partir da pró-IL-1 β . Este último passo envolve a ação de uma cisteína-protease ativada em decorrência de um processo inflamatório, conhecida como Caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1 β em IL-1 β . Recentemente, nosso grupo demonstrou que a caspase-1 tem um papel importante na gênese da dor inflamatória, sendo crucial para a geração de IL-1 β e consequentemente COX2/PGE2. Porém, não são conhecidos os mecanismos de ativação da caspase-1 na hiperalgesia inflamatória. Sabe-se que a ativação da Caspase-1 e clivagem da pro-IL-1 β são dependentes de uma plataforma molecular intracelular denominada inflamassoma. Os principais inflamassomas ativadores de caspase-1 são formados pelas proteínas NLRP3, IPAF (NLRC4) e por sua molécula adaptadora ASC. O objetivo desse trabalho então foi avaliar a participação do inflamassoma na gênese da dor inflamatória. Nós identificamos que as moléculas IPAF e ASC, mas não o NLRP3, participa no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória mecânica e térmica induzida pela carragenina. Observou-se que estas moléculas são cruciais para a ativação da Caspase-1 e, consequentemente, para a produção da IL-1 β ativa. Estes resultados evidenciam

pela primeira vez um papel importante do inflamassoma no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória.

Palavra chave: Carragenina, Dor inflamatória, Inflamassoma, IL-1 β , Caspase-1, NLRC4, NLRP3, ASC.

ABSTRACT

LOPES, A. H. P. Investigation of **Inflammasome participation in the genesis of inflammatory pain**. Thesis (Master) - Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2013.

The inflammatory hyperalgesic is the process by which occurs the sensitization of nociceptors primary afferent neurons by inflammatory chemical mediators, that generating a decreased nociceptive threshold and result in episodes of pain. Among the main of nociceptive mediators involved with sensitization of peripheral nociceptive fibers are prostaglandin E2 (PGE2), which is released as a final product of a cascade of inflammatory mediators. Within this hierarchical cascade of release can highlight interleukin-1 β (IL)-1 β , a cytokine important in the genesis of inflammatory pain due to their ability to induce the production of the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) and consequently PGE2. The control mechanism production of intracellular IL-1 β involved two steps: induction of expression of a protein inactive form (pro-IL-1 β) and the generation of the biologically active form from pro-IL-1 β (IL-1 β). This last step involves the action of a cysteine protease-activated due to an inflammatory process, known as Caspase-1, which cleaves pro-IL-1 β to IL-1 β . Recently our group has demonstrated that caspase-1 plays an important role in the genesis of inflammatory pain, crucial for the generation of IL-1 β and consequently COX2/PGE2. However, there aren't known mechanisms of activation of caspase-1 in inflammatory hyperalgesic. It is known that the activation of Caspase-1 cleavage and pro-IL-1 β are dependent on an intracellular molecular platform called inflammasome. The main inflammasome activators of caspase-1 proteins are formed by NLRP3, IPAF (NLRC4) and its adapter molecule ASC. The aim of this study was to evaluate the inflammasome participation in the genesis of inflammatory pain. We have identified molecules IPAF and ASC, but not NLRP3, is participate in the development of mechanical and thermal inflammatory hyperalgesic induced by carrageenan. It was observed that these molecules are crucial for the activation of Caspase-1 and thus for the production of active IL-1 β . These results demonstrate for the first time an important role of the inflammasome in the development of inflammatory hyperalgesic.

Key Word: Carrageenan, inflammatory pain, Inflammasome, IL-1 β , Caspase-1, NLRC4, NLRP3, ASC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Dor	22
1.2 Dor inflamatória.....	25
1.3 O inflamassoma-plataforma de ativação da caspase-1.....	29
2 OBJETIVO.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Animais Experimentais.....	36
3.2 Preparo de Soluções, drogas e reagentes.....	37
3.3 Modelo experimental de hiperalgesia inflamatória.....	41
3.4 Western Blotting.....	44
3.5 Quantificação da migração de neutrófilos.....	45
3.6 Quantificação da concentração de citocinas	46
3.7 Coleta de Macrófagos.....	47
3.8 Cultura primária de macrófagos peritoneais.....	47
3.9 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXO.....	113

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

“A dor é um dos fenômenos mais dramáticos, complexos e universalmente difundidos” (Bonica apud Knoplich, 1983).

1.1 Dor

A dor compreende uma das funções fisiológicas fundamentais no controle e manutenção da homeostase, pelo qual nosso corpo identifica potenciais agentes de dano e lesões teciduais. Esse componente fisiológico nos preserva dos excessos e prejuízos, que se não forem controlados podem se tornar uma doença. Nosso organismo possui um sistema de vigília que nos avisa frente uma injúria tecidual/celular. No processo de evolução, a dor é considerada um dos mais importantes parâmetros fisiológicos, pois é ela que identifica e alerta o indivíduo que sua integridade está em perigo (LOESER & MELZACK, 1999).

Desde os primórdios da humanidade, já havia a preocupação em entender e controlar a dor, seja ela física e/ou psíquica, pois em alguns momentos ela pode se pronunciar como um tormento, uma aflição ou tristeza levando ao isolamento do indivíduo. Na Grécia antiga o filósofo Hipócrates acreditava que a dor era causada por desvios dos processos naturais devido a alterações dos “humores” (BONICA, 1990; PRITHVI, 1996). Outros filósofos tentaram pontuar a dor no intuito de racionalizar esse universo até então desconhecido, Descartes propôs que a dor era resultado do desequilíbrio entre o sistema nervoso periférico e o cérebro, tendo como protagonista a percepção da alma, advindas de ações externas, que por fim refletiria sobre o corpo ou ao seu interior (TEIXEIRA; OKADA, 2003).

Tem sido discutido que a dor poderia comportar-se como um sentido primário semelhante aos outros sensores do nosso corpo como audição, visão, olfato, gustação e tátil. Além disso, quando esse sentido vem agregado a uma experiência emocional passada, o indivíduo pode relatar emoções desagradáveis advindas da associação biológica e psíquica. A maioria dos pesquisadores, no entanto, considera a dor como uma resposta a percepção evocada por estímulos nocivos que pode ser modulada a partir de experiências passadas ou ação de fatores externos. Nesse intuito, a dor pode caracterizar um estado físico mediado pela percepção de cada indivíduo, na qual se comporta de diferentes maneiras entre as pessoas, pois é baseado na interpretação que fazem da sua própria experiência vivida. Por este motivo, a percepção é peculiar e diferente para cada um de nós, cada pessoa percebe um estado emocional ou uma situação de acordo com os aspectos que têm especial importância para si própria.

Essas características fazem com que a experiência de dor seja um dos mais complexos estados de percepção, sentida pelo indivíduo. Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. Portanto apesar de existir uma base anatômica e fisiológica para a detecção e transmissão de mensagens interpretadas como dolorosas, mediado pelos receptores sensoriais especializados (nociceptores) (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999), o que torna a experiência de dor tão especial é que há sempre uma qualidade profunda emocional à experiências passadas, que inclui atenção e aprendizagem (LOESER; MELZACK, 1999). Recentemente, nosso grupo vem trabalhando com uma forma mais simplificada dessa definição, considerando a dor como a

“Percepção Desagradável de uma Sensação Nociceptiva”. Este conceito aborda dois importantes componentes da dor, a nocicepção e a percepção. A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta de processos que codificam um estímulo capaz de comprometer a integridade física do organismo. Portanto a dor é mais que somente uma manifestação da experiência sensorial que alerta sobre o perigo, ela vem acompanhada do fator afetivo-emocional (percepção).

A partir destes conceitos a nocicepção pode ser evocada pela ativação dos nociceptores, que fornecem informação sobre o tecido lesado. No entanto, nem todos os estímulos que ativam nociceptores são necessariamente vivenciados como dor. A dor também pode ser amplamente descrita como uma experiência multidimensional seja ela fisiológica, religiosa, cognitiva, afetiva, etnocultural. Por esses motivos os tratamentos se tornam complexos, podendo redimensionar a rotina diária do indivíduo que a descreve.

Para Engel (1975) a dor é conceituada como uma sensação transmitida ao corpo, que representa o sofrimento induzido pela percepção psíquica de uma agressão real, eminente ou fantasiado. Quando ela se torna persistente, pode ela mesma vir a ser a doença, tornando-se debilitante e crucial (JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS et al., 2006). Diante de todos os aspectos abordados, a dor então pode ser considerada como uma importante morbidade contemporânea capaz de associar danos biológicos e psíquicos.

1.2 Dor Inflamatória

O sistema nervoso é uma importante estrutura capaz de captar e processar reações provenientes do ambiente, frente a um estímulo nocivo. Estes estímulos são conduzidos pelas terminações nervosas livres dos neurônios aferentes primários, localizados na periferia. As estruturas especializadas conhecidas como nociceptores podem ser ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, incluindo mediadores que são produzidos por vários tipos de células, por exemplo, após uma injúria celular local ou devido a uma disfunção celular. No caso da lesão tecidual, mediadores específicos primários podem ser liberados e atuar na membrana neuronal (em receptores metabotrópicos ou ionotrópicos), desencadeando o processo de sensibilização e/ou ativação dos nociceptores (FERREIRA e NAKAMURA,1979; KHASAR et al., 1999; NAKAMURA e FERREIRA,1987).

Durante o processo inflamatório, os mediadores químicos liberados no local do dano tecidual por células residentes, desencadeiam reações sequenciais (hierarquia temporal de liberação), episódio este responsável pela gênese da dor inflamatória (KANDEL et al., 2000). Dentre estes mediadores nociceptivos, podemos destacar os derivados lipídicos como as prostaglandinas (PGs) (FERREIRA, 1983), os leucotrienos (CUNHA et al., 2003), as endotelinas (YANAGISAWA et al., 1988; FERREIRA et al., 1989), as citocinas como o TNF- α e a Interleucina (IL)-1 β ; e as aminas simpatomiméticas (noradrenalina e dopamina). Esses mediadores inflamatórios merecem destaque, pois são possíveis alvos terapêuticos, importantes no controle da dor inflamatória, vale dizer que ao bloquear a ação desses mediadores, observamos alívio da dor inflamatória

(NAKAMURA; FERREIRA, 1987; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 2002; PARADA et al., 2003).

Dentre os mediadores hiperalgésicos diretos destacam-se as prostaglandinas, principalmente as da série E (PGE₂), considerada como produto capaz de sensibilizar diretamente os nociceptores, que por sua vez gera o quadro de hiperalgesia, ou seja, um aumento na sensação dolorosa (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978; MARTIN et al., 1987).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado e demonstrado os mecanismos de geração de PGE₂ na hiperalgesia inflamatória, tendo identificado diversas citocinas atuantes nesse processo. FERREIRA et al., (1988) demonstrou que a Interleucina-1 β (IL-1 β) pode induzir hiperalgesia mecânica via indução da enzima ciclooxigenase-2 (COX2) e conseqüentemente indução da produção e liberação do mediador final PGE₂ (SCHWEIZER et al., 1988; FOLLENFANT et al., 1989; WATKINS et al., 1994). Ainda existem outros mediadores que são produzidos no sítio inflamatório que podem participar da gênese da hiperalgesia inflamatória como, por exemplo, o TNF- α e o CXCL8. Para CUNHA et al., (1991), o envolvimento da quimiocina CXCL8 é importante na gênese da hiperalgesia inflamatória, por um mecanismo dependente da liberação de aminas simpáticas.

Tendo em vista esses trabalhos descritos, em um modelo de estudo para avaliar a hiperalgesia mecânica em ratos, levou as primeiras observações de que a citocina TNF- α é liberado após a administração de um estímulo inflamatório seguido da liberação de IL-6 e IL-1 β , as quais estimulam a produção de prostanóides e, em um outro momento também ocorria à liberação de CXCL8 culminando na produção/liberação de aminas simpáticas (VERRI et al., 2006). Este conceito nos permite entender porque a inibição de apenas uma das vias (IL-1 β ou

CXCL8) não resulta em analgesia completa, bem como porque o bloqueio do TNF- α ou da produção de citocinas com o uso de glicocorticoides observamos um quadro antinociceptivo.

Sabendo-se que existe uma hierarquia de liberação entre os mediadores químicos e a importância das citocinas na hiperalgesia inflamatória, nosso grupo investigou se o mesmo ocorria em camundongos, e foi demonstrado que também existe uma cascata de liberação das citocinas após um estímulo inflamatório, com algumas peculiaridades importantes. Em camundongos, a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina depende não só do TNF- α , mas também da quimiocina CXCL1/KC, sendo estas as primeiras citocinas a serem liberadas, sucedidas pela IL-1 β , que por sua vez estimula a produção de PGE2 via indução da COX2. Além disso, a quimiocina CXCL1/KC também pode induzir a liberação de aminas simpatomiméticas (Figura 1).

Figura 1. Diagrama representativo da cascata de citocinas, utilizando modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina. Demonstrando a liberação sequencial de mediadores inflamatórios iniciado pela Cg e liberação intermediária pelas citocinas, culminando na indução final pelos prostanóides (PGs) e aminas simpáticas (AS) (Modificado de CUNHA et al., 2005).

1.2.1 Papel da Interleucina 1 β na Dor Inflamatória

A família da interleucina-1 (IL-1) é composta por três importantes ligantes IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra (DINARELLO, 1996; AREND, EVANS, 2003). Consolidam sua ação efetiva e efeito em células alvo após ativarem receptores específicos de membrana do tipo IL-1R (OKA et al., 1993). Tem sido demonstrado que a IL-1 β está envolvida em várias funções do processo inflamatório, tais como o recrutamento de células leucócitos do sangue, febre, liberação de proteínas da fase aguda e o aumento de permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO, 1984; GOLDBLUM et al., 1988; MOSER et al., 1989). O fato da IL-1 β estimular a expressão de COX-2 e por fim o subproduto PGE2 sugere que a IL-1 β é um importante mediador químico da hiperalgesia inflamatória. Paralelo a isso, com grande relevância a IL-1 β foi relatada pela primeira vez como uma citocina capaz de mediar a nocicepção inflamatória em modelos animais (FERREIRA et al., 1988).

Nesse sentido foi demonstrado que a injeção intraplantar de IL-1 β , mesmo em pequenas doses (picogramas) produz um estado hiperalgésico mecânico que depende da liberação de prostanóides (FERREIRA et al., 1988). Esses dados corroboram com achados de outros grupos que também demonstraram que a hiperalgesia observada após a administração i.p. de LPS em ratos é mediada pela IL-1 β (WATKINS et al., 1995). Neste modelo, parece que a hiperalgesia mediada por citocinas é independente de prostanóides, sugerindo um efeito direto da IL-1 β , embora outros mediadores possam participar, tais como as aminas simpáticas, leucotrienos, e /ou endotelinas.

Baseado em evidências, testes experimentais utilizando a IL-1Ra, inibidor da atividade da IL-1 β , demonstrou atenuação no desenvolvimento da

hiperalgesia inflamatória, pelo fato de bloquear citocinas como a bradicinina, TNF- α e a IL-1 β , componentes esses essenciais no desenvolvimento da cascata de citocinas liberadas após um estímulo alógeno (CUNHA et al., 2000).

1.3 O Inflamassoma - plataforma de ativação da Caspase-1.

Ao contrário de outras citocinas pró-inflamatórias, o precursor inativo pro-IL-1 β requer clivagem para se tornar uma citocina bioativa, que depende de um processo enzimático. Sabe-se que a produção e liberação da IL-1 β compreendem dois fenômenos celulares distintos: 1) indução da pro-IL-1 β e 2) clivagem da pró-IL-1 β em IL-1 β ativa, os quais são controlados por diferentes estímulos celulares. A expressão da pro-IL-1 β pode ocorrer após ativação das vias de sinalização de NF-Kappa B (fator nuclear kappa B) e MAPK (Proteína-quinases ativadas por mitógenos), mediante ativação de receptores de membrana TLRs (receptores do tipo Toll like) e proteínas citosólicas NLRs (receptores do tipo NOD-like) (FRANCHI et al., 2009). Uma das mais importantes cisteínas proteases responsáveis pelo processo de clivagem intracelular da pro-IL-1 β é a caspase-1. A caspase-1 foi a primeira a ser identificada estando presente no citosol das células fagocitárias como um zimógeno inativo (CERRETTI et al., 1992; THORNBERRY et al., 1992). A ativação da caspase-1 é considerada, um evento chave da resposta imune inata, que depende dos PRRs (receptores de reconhecimento padrão) para identificar os PAMPs (padrões moleculares associados ao reconhecimento de patógeno). A estrutura molecular da caspase-1 é composta por uma porção inativa denominada (pro-caspase-1), na qual, contém um domínio CARD (domínio de recrutamento e ativação de caspase), uma porção central e uma subunidade com peso molecular 45 KDa. Desta forma, a pro-caspase-1 quando submetida ao processo de

dimerização autoproteolítica, onde a porção N-terminal CARD é removida, resulta na reformulação da estrutura principal em pequenas subunidades conhecidas como (p20 e p10) (YAMIN et al., 1996; MARTINON; TSCHOPP, 2007).

A ativação da pro-caspase-1, em resposta a sinais de perigo, depende de um grande complexo multiproteico que permite à ligação aos domínios de nucleotídeos ricos em leucina a molécula adaptadora ASC (Apoptose associada à proteína Speck-like contendo domínio de recrutamento de Caspase) (MARTINON et al., 2004; LAMKANFI et al., 2007). Esta formulação molecular foi denominada inflamassoma, como uma analogia ao apoptossoma, plataforma de proteínas que dirige a ativação da caspase-9 durante a apoptose (INOHARA; NUNEZ, 2003; INOHARA et al., 2005).

Alguns autores demonstraram que esse complexo multiproteico, é formado por proteínas pertencentes à família dos NLRs (receptores NOD-like). Existem, pelo menos, quatro tipos diferentes de inflamassomas que podem ser destacados: NALP1/NLRP1, NALP3/NLRP3, IPAF/NLRC4 e a HIN-200 membro da família, AIM2 (SCHRODER K, TSCHOPP J, 2010; LAMKANFI M, DIXIT VM, 2009). Estes receptores moleculares são ativados por estímulos específicos que desencadeiam o processo de auto-ativação da caspase-1. O inflamassoma NLRP3 é possivelmente o mais estudado, na qual exige na sua conformação a proteína adaptadora ASC, que leva uma forte resposta inflamatória mediada pela secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18 (BECKER et al., 2009). Diversos estímulos podem induzir sua ativação incluindo, vários cristais, irritantes da pele, PAMPS, toxinas microbianas etc (SCHRODER E TSCHOPP, 2010). Por exemplo, dados apontam que animais deficientes para NLRP3 e ASC são extremamente defeituosos na ativação de caspase-1 e subsequente liberação de IL-1 β /IL-18

(MARIATHASAN et al., 2006). Estes resultados sugerem que a montagem e ativação do complexo proteico inflamassoma NLRP3 são influenciados por sinais de estresse celular. Recentemente também foi proposto que a liberação de urato monossódico (MSU) e cristais de pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD), associados a doenças como a gota e a pseudo-gota, podem agir como sinais de perigo celular para acionar o inflamassoma NLRP3 (MARTINON et al., 2006).

Além do NLRP3 desempenhar importante papel frente a diversos estímulos, como sensor de estresse da célula hospedeira, o inflamassoma NLRC4 (IPAF) tem sido descrito como essencial no processo de indução da inflamação e controle de infecção bacteriana (SUTTERWALA E FLAVELL, 2009).

O inflamassoma NLRC4 pode ser composto por outros NLRs conhecidos como Naip5/Birc1 e, não necessitam da proteína adaptadora ASC (ZAMBONI et al., 2006; LIGHTFIELD et al., 2008; CASE et al., 2009). Dessa maneira, foi descrito originalmente como sendo um dos inflamassomas importante na ativação de caspase-1 que pode estar relacionado à resposta do hospedeiro contra patógenos bacterianos intracelulares, tais como *Salmonella* entérica sorotipo Typhimurium (*S. typhimurium*) e *Legionella pneumophila* (MARIATHASAN et al., 2004; AMER et al., 2006; FRANCHI et al., 2006; MIAO et al., 2006; ZAMBONI et al., 2006). Existem evidências que a flagelina de *S. typhimurium* e *L. pneumophila* é necessária e suficiente para acionar o inflamassoma NLRC4 em macrófagos, que por sua vez é independente de NLRP3 (FRANCHI et al., 2006 ; MIAO et al., 2006 ; LIGHTFIELD et al., 2008; SILVEIRA e ZAMBONI , 2010; WHITFIELD et al., 2010).

Elucidado a importante participação das citocinas pró-inflamatórias, bem como a montagem do inflamassoma, cujo desempenha importante papel

regulatório na liberação da IL-1 β , é sugestivo que o inflamassoma pode ser a chave no desenvolvimento da dor inflamatória. Para CUNHA et al., (2010), ficou claro que a hiperalgesia inflamatória é dependente da caspase 1, visto que animais deficientes para esta enzima desenvolvem uma menor resposta nociceptiva no teste de von frey mecânico, ao estímulo com carragenina. Além disso, para reforçar esses achados animais foram pré-tratados com o inibidor de caspase-1 (YVADCMK), foi observado redução da hiperalgesia mecânica de maneira dose-dependente. De fato, o papel da caspase-1 neste processo de dor, deve-se a sua participação no processo de maturação da IL-1 β em nível periférico, pois foi demonstrado por imunoblot menores níveis da expressão proteica dessa citocina inflamatória, a IL-1 β . Porém, os mecanismos promissores de ativação da caspase-1 durante o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória ainda não foram totalmente determinados.

Esses estudos sugerem que o inflamassoma constitui alguns dos sensores importantes relacionados ao estresse celular e conseqüentemente ao processo inflamatório local. No entanto, nenhum trabalho investigou seu papel na gênese da dor inflamatória. De maneira inovadora nós propomos a investigar e esclarecer com mais critérios qual inflamassoma NLRP3 ou IPAF e a molécula adaptadora ASC participam da hiperalgesia inflamatória, uma vez que são capazes de ativar a enzima caspase-1, resultando na liberação final de IL-1 β ativa.

2. OBJETIVO

2 OBJETIVO.

O objetivo do presente estudo foi investigar a participação dos inflamassomas NLRP3 e IPAF (NLRC4) e da molécula adaptadora ASC na gênese da hiperalgesia inflamatória.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética para experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo no 149/2011, ver anexo 1), seguindo os princípios e diretrizes para uso de animais experimentais em estudos de dor da IASP (ZIMMERMANN, 1983).

3.1 Animais Experimentais.

Para o desenvolvimento experimental foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 machos de 20 a 25g (animais selvagens), proveniente do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto. Além destes, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para *asc*^{-/-}, *ipaf*⁺(NLRC4) e caspase 1^{-/-}, provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os Camundongos deficientes para *nlrp3*^{+/+} e *il-1β*^{-/-}, provenientes do biotério de Imunologia e Neurogenética Experimental do Centro Nacional de Pesquisa Científica (CNRS) Universidade de Orléans - França foram cedidos em colaboração com o Professor Dr. Bernhard Ryffel. Foram utilizados no mínimo cinco animais por grupo experimental, os quais permaneceram acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições controladas de temperatura e ciclo claro/escuro, com livre acesso a água e comida, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.2 Preparo de soluções, drogas e reagentes:

3.2.1 Solução de tampão salina-fosfato (PBS)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck).....	8,0 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck).....	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , Merck).....	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , Merck).....	0,2 g
Água Milli-Q q.s.p.....	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl e a solução final autoclavada e estocada em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

3.2.2 PBS/EDTA (1mM)

PBS.....	100 mL
EDTA (Merck).....	37,2 mg

3.2.3 Líquido de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck)	20 mL
Azul de metileno (Merck).....	0,5 g
Água Milli-Q q.s.p.....	1 L

3.2.4 Tampões utilizados para imunoblot

Solução I –TBS 10% (Tampão Salino Fosfato com Tween 20)

Tris.....	60,5g
NaCl.....	87,87g
Água mili-Q q.s.p.....	1L

Ajustar pH=8,0 no momento da utilização realização diluição 1:10 adicionar 0,5% de tween 20.

Solução II- SDS 10%

SDS.....	10g
Água mili-Q.....	100ml

Solução III – Tampão de amostra

0,5M tris-HCL pH 6.8.....	1ml
Glicerol.....	0,8ml
SDS 10%.....	1,6ml
2-Mercaptoetanol.....	0,4ml
1% Azul de bromofenol.....	0,4ml
Água Deionizada.....	3,8ml

Após preparo alíquotas são acondicionadas a temperatura de – 20°C

Solução IV – Tampão eletroforese 10%

Tris 25mM	30g
Glicina 250mM pH=8,3	144,2g
SDS 1%.....	100ml
Água Destilada.....	1L

Solução V – Bis/Acrilamida

Acrilamida.....	29g
N' Bis-Metileno.....	1g
Água mili-Q.....	100ml

Solução VI - 1,0M tris-HCl

Tris base.....	12,11g
Água mili-Q.....	100ml

Ajustar pH=6,8 armazenar em vidro âmbar a temperatura de 4°C .

Solução VII - 1,5M tris-HCl

Tris base..... 27,24g

Água mili-Q..... 100ml

Ajustar pH=8,8 armazenar em vidro âmbar a temperatura de 4°C .

Solução VIII – Eletrotransferência

Tris 25mM..... 3,02g

Glicina 192mM 14,40g

Água mili-Q..... 1L

No momento do preparo adicionar 20% de metanol a membrana foi equilibrada nesse tampão por 10 minutos apenas.

3.2.5 Meio de Cultura RPMI 1640 Incompleto

RPMI 1640 (Sigma)..... 10,4 g

Bicarbonato de Sódio P.A. (Merck)..... 2,2 g

Hepes (Sigma)..... 2,34 g

Água Milli-Q q.s.p..... 1L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl o produto final foi filtrado e estocado em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizado.

3.2.6. Meio de Cultura RPMI 1640 Completo

RPMI 1640 incompleto..... 1L

20% Soro fetal bovino..... 200ml

Penicilina/Gentamicina (Sigma)..... 150 UI/mL

Streptomicina (Sigma)..... 100 µg/mL

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl o produto final filtrado e estocado em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizado.

3.2.7 Tampões utilizados para o ensaio de ELISA

Solução de ligação (binding buffer) pH 9.0

Na₂PO₄ (Merck)..... 0.1M

Tampão substrato pH 5.0

Acido cítrico (Merck)..... 34,7mM

Na₂PO₄ (Merck)..... 66,7 mM

Substrato

OPD (Sigma)..... 0,4 mg

H₂O₂ (Merck)..... 0,4μL

Tampão substrato q.s.p..... 1 mL

3.2.8 Drogas

Veículo

Carragenina (FMC Corp, Philadelphia, PA, USA).

Salina 0,9%

TNF-α (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, U

Salina 0,9%

IL-1 β (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, U

Salina 0,9%

PGE2 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Salina 0,9%

Nigericina (Sigma 7143)

Anticorpo Anti-IL-1 β (Sigma i 3767)

Anticorpo Anti-Caspase-1 (Sigma C4851)

3.3 Modelo experimental de hiperalgesia inflamatória.

A indução da hiperalgesia inflamatória foi realizada pela administração intraplantar (i.pl) de Carragenina (100 ug/20 µl) na pata posterior direita de camundongos.

3.3.1 Avaliação nociceptiva.

O teste de hiperalgesia inflamatória mecânica foi realizado regularmente no período entre 8:30h até 17:00 h.

3.3.2 Teste de pressão crescente na pata (von Frey eletrônico) .

A avaliação da hiperalgesia inflamatória mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito (CUNHA et al., 2004). Este método utiliza-se de um anesthesiômetro, composto de um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira de 0,5 mm² que estimula diretamente a pata do animal. O experimentador foi treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica como retirada da pata (Figura 2). A intensidade de hiperalgesia mecânica foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação após a administração dos estímulos, como procedimento de adequação dos animais experimentais foi necessário posiciona-los nas caixas individuais de acrílico, em média

25 minutos antecedente ao início experimental para ambientação, especificamente em uma sala própria para avaliação comportamental.

Figura 2 – Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongos (von frey mecânico). Painel a- A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments CA, USA), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malhas e o espelho, utilizados no teste de pressão crescente na pata. **Painel b-** A foto apresenta a ponteira de área (0,5 mm²) em contato com a pata do animal. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro plantar do camundongo até que o animal emita o comportamento nociceptivo.

3.3.3 Teste de hiperalgesia térmica (Hargreaves).

O teste de Hargreaves descrito 1988 consiste no aquecimento da região central plantar traseira de animais experimentais, por meio de uma fonte radiante de luz infravermelha. O comportamento nociceptivo é avaliado a partir da sensibilidade ao calor (hiperalgesia térmica), determinada pela latência de retirada da pata exposta ao raio de luz pontual. O limite máximo permitido para exposição da pata ao raio infravermelho é de 15 segundos, no sentido de evitar danos teciduais.

Os animais são colocados e posicionados em compartimentos de acrílico individuais, localizado sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem de luz e do calor de forma homogênea. Cinco minutos são utilizados para ambientação dos animais aos compartimentos. Após esse período, a fonte de luz infravermelho, colocada sob cada uma das patas traseiras do animal, é acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, no momento em que o animal responde removendo a pata caracterizando um “flinch”, a fonte de luz e o relógio param automaticamente. Duas ou três medidas são realizadas com um intervalo de tempo de 5 a 10 minutos entre as mesmas. As medidas de latência de retirada da pata são expressas como avaliações absolutas em cada tempo de observação (HARGREAVES, et al., 1988).

3.4 Western Blotting

A expressão proteica da IL-1 β em sua forma inativa (pró-IL-1 β ; ~ 35 kDa) e ativa (~ 17 kDa) e Caspase-1 inativa (~ 45 kDa) e ativa (~ 20 kDa) foi analisada em amostras de tecido plantar de camundongo por meio da técnica de imunoblot. Para tal, os animais foram eutanasiados em Câmara de CO₂ e, rapidamente decaptados para remoção do sangue corpóreo (hemorragia) em seguida amostras do tecido plantar foram removidos em diferentes tempos após a injeção i.pl de carragenina e salina. As amostras armazenadas e congeladas em temperatura -70 °C foram homogeneizadas e lisadas com auxílio de um Polytron (PT3100), em tampão apropriado, contendo um mistura de inibidores de proteinase (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; Na-deoxicolato 1%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; SDS 0,1%; PMSF 1mM ; Aprotinina, leupeptina e pepstatin 1 mg/mL cada). Todas as amostras foram centrifugadas a 10000rpm por 10min, uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas. As proteínas foram separadas por SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE-15%) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). As membranas foram incubadas por 2 hrs a 4°C com tampão de bloqueio, seguido da incubação com os anticorpos primários apropriados, anticorpo anti-IL-1 β polyclonal (Sigma i3767) foi utilizado na concentração de 1:200 e anticorpo anti-Caspase-1 polyclonal (Sigma C4851) foi utilizado na concentração de 1:500 "overnight" a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente e então exposto ao kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.), como descrito no manual de instruções. As membranas foram colocadas em um fotodocumentador que foi digitalizado em Imagem para análise. Um

sistema de imagens em computador (Chemic Doc TM XRS+ System, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) foi utilizado para medir a intensidade da densidade óptica de cada banda. A expressão da β -actina (1:3000; Abcam, Cambridge, MA, EUA) foi utilizado para obter os controles.

3.5 Quantificação da migração de neutrófilos para o tecido plantar.

A migração de neutrófilos para os tecidos da pata posterior direita dos animais foram avaliadas indiretamente usando a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) por meio de um ensaio colorimétrico. Amostras de tecido subcutâneo plantar foram coletados em tampão contendo NaCl 0,1M ; Na₂ EDTA 0,015 M; NaPO₄ 0,02 M e mantidos a -70 ° C até o uso. As amostras foram homogeneizadas usando um Polytron (PT3100), centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, em seguida foi adicionado NaCl 0,2% e homogeneizado novamente, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, em seguida adicionado tampão contendo NaPO₄ 0,05M (ph 4,7) e 1 g H-TAB (Hexadecil Timetil Amônio Bromide) , após centrifugar o sobrenadante resultante foi utilizado para análise da atividade de MPO ao comprimento de onda 450 nm (Spectra max). Resumidamente, 5ul de amostra foi misturada com 45ul de Tampão NaPO₄ 0,08M, pH 7,0; 25ul de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine); 100ul de H₂O₂ 0,05mM (Peróxido de hidrogênio 30% 1:10) ;75 ul de H₂S₀₄ - 4M. Os resultados são apresentados como atividade de MPO (número de neutrófilos por mg de tecido).

3.6 Quantificação da concentração de citocinas.

Após realizada a injeção com estímulo inflamatório, os animais foram eutanasiados na Câmara de CO₂, em seguida os tecidos da região plantar foram removidos. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em 500 uL Tampão fosfato-salino PBS acrescido de EDTA (10mM) seguido de uma centrifugação de 10 min a 400 g. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar os níveis de TNF- α , IL-1 β e KC (CXCL1) pelo enzyme-linked immunosorbent ensaios (ELISA). Resumidamente placas de 96 poços foram incubadas por toda a noite a 4 °C com anticorpos contra TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 murinas dosadas de acordo com a concentração de cada citocina a ser quantificada. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas pela incubação por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas e incubadas a 4C⁰ por 24 horas. As placas foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinilados contra TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 murinas, diluídos na proporção que se enquadre melhor a cada citocina e quimiocina, foram adicionados (100 ul/poço). Após uma incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 ul de avidina-HRP diluída 1:5000 foi adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50 ul do reagente colorido (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma USA) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1M e as absorbâncias foram determinadas a 490 nM. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões. Além disso, os resultados foram

expressos em picogramas da respectiva citocina por mililitro. Como controle foi utilizado os níveis das citocinas que foram determinadas em camundongos injetados (i.pl) com salina.

3.7 Coleta de Macrófagos para cultura primária.

Os macrófagos foram isolados, através do lavado da cavidade peritoneal provenientes de animais intactos, com o auxilio de uma agulha acoplado a seringa utilizando 3 ml de PBS estéril. O conteúdo total do lavado foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, o conteúdo celular foi resuspenso em 1ml de Meio RPMI completo, contendo (20% soro fetal bovino, 2,34g Hepes (Sigma), 150UI/ml Penicilina/Gentamicina (Sigma), 100ug/ml Streptomicina (Sigma), 2,2g Bicarbonato de Sódio P.A. (Merck), para 1L Água mili-Q q.sp. Uma pequena fração foi utilizado para contagem total de células, em seguida foram plaqueados em um volume total de 200 ul pré-incubados a 37 °C overnight.

3.8 Cultura primária de macrófagos peritoneais.

As células provenientes da cavidade peritoneal de camundongos intactos foram cultivadas na presença de meio de cultivo ou estímulo. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, no interior dos quais foram cultivadas $2,0 \times 10^5$ células/poço. As células foram mantido “overnight” em RPMI completo, no dia seguinte foram lavadas gentilmente para receberem os estímulos. A Carragenina nas doses de (30 ug/ml, 100 ug/ml e 300 ug/ml) previamente filtrada foram adicionados nos poços de cultivo durante

4 horas, após esse período o sobrenadante e o lisado de células foram coletados e preparados para análises.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 5 animais por grupo. As análises dos resultados foram realizadas pelo método de variância a um critério (ANOVA TWO-WAY), e comparações post-hoc foi utilizado teste de Bonferroni, de acordo com as variáveis e grupos comparados sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$, foram determinados utilizando GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA).

4. Resultados

4 RESULTADOS.

4.1 IL-1 β é a citocina chave no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória.

Para reforçar a idéia de que a IL-1 β é citocina de alarme importante na indução da hiperalgesia inflamatória, na primeira parte deste estudo, investigamos o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos deficientes para a IL-1 β . Como pode ser observado, o limiar mecânico basal dos animais deficientes para a IL-1 β não diferem significativamente dos limiares nociceptivos basais dos animais selvagens (Figura 1A). Por outro lado, os animais selvagens desenvolvem intensa hiperalgesia inflamatória mecânica após a administração intraplantar de carragenina, quando comparado aos animais que recebeu salina, os animais deficientes para a IL-1 β apresentam redução quase que total deste fenômeno em todos os tempos avaliados (Figura 1B).

Figura 1- Desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória mecânica em animais deficientes para IL-1 β . (A) Avaliação do limiar nociceptivo mecânico basal de animais WT ou salina e IL-1 β ^{-/-} utilizando o vonFrey eletrônico (B) Avaliação temporal demonstrando hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata) entre os diferentes grupos. Os efeitos hiperalgésicos mecânicos foram avaliados 0.5 ,1, 3 e 5 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre animais WT/Cg comparado com o grupo IL-1 β ^{-/-}/Cg.

4.2 A hiperalgesia inflamatória não é dependente do inflamassoma NLRP3.

Para iniciar a investigação da participação do inflamassoma nos mecanismos envolvidos na gênese da hiperalgesia inflamatória, inicialmente hipotetizamos que o inflamassoma NLRP3 seria a plataforma molecular chave na geração de IL-1 β e dor. Para isto foi avaliado o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória em animais geneticamente deficientes para NLRP3 após administração de carragenina intraplantar (i.pl.). O registro inicial do limiar nociceptivo basal dos animais, não indicou nenhuma diferença entre os animais selvagens e deficientes para NLRP3, na ausência do estímulo inflamatório (figura 2A). Observamos que a resposta da hiperalgesia inflamatória mecânica foi máxima nos tempos de 3 e 5 horas após injeção i.pl da carragenina. A resposta hiperalgésica induzida pela carragenina em animais deficientes para NLRP3 não demonstrou diferença quando comparada aos animais selvagens (Figura 2B). Paralelamente, amostras do tecido plantar foram preparadas para análises de recrutamento de neutrófilos e produção de IL-1 β . Como pode ser observado, nem a migração de neutrófilos (Figura 3), nem a produção de IL1 β (Figura 4) induzidos pela administração intraplantar de carragenina foram afetados pela deficiência no gene de NLRP3^{-/-}. Neste experimento, animais geneticamente deficientes para IL-1 β foram utilizados como controle negativo (Figura 4). Consideramos então que o inflamassoma NLRP3 não está envolvida na gênese dor inflamatória, a partir desses parâmetros avaliados.

Figura 2- Participação do NLRP3 na gênese da hiperalgesia inflamatória.

(A) Avaliação do limiar basal mecânico de animais WT ou Salina e NLRP3^{-/-} utilizando (Vonfrey eletrônico) **(B)** Avaliação temporal demonstrando hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata) entre os diferentes grupos. Os efeitos hiperalgésicos mecânicos foram avaliados 0,5, 1, 3 e 5 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre animais WT/Cg e NLRP3/Cg comparado com o grupo WT/Salina.

Figura 3 – Recrutamento de neutrófilos em animais geneticamente deficientes para NLRP3. Animais WT ou Salina e deficientes para NLRP3 receberam injeção intraplantar de carragenina (100 ug/pata). Após a 5 h de estímulo, a atividade de migração de neutrófilos foi determinada pela análise de MPO no tecido. Os dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. de 5 animais por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo WT/Cg e NLRP3^{-/-}/Cg.

Figura 4- Produção de IL-1 β em animais geneticamente deficientes para NLRP3. Animais WT ou salina e deficientes para NLRP3/IL-1 β receberam injeção intraplantar de carragenina (100 ug/pata) após 5 h, as amostras de tecido plantar foram removidas. Os níveis de IL-1 β foram determinados pelo método de ELISA. Os dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ Indica diferença estatisticamente significativa dos animais IL-1 β ^{-/-}/Cg em relação aos grupos WT/Cg e NLRP3/Cg.

4.3 O papel dos inflamassomas IPAF(NLRC4)/ASC na hiperalgesia mecânica induzido pela carragenina.

Surpreendentemente após a primeira observação experimental negativa identificando que o inflamassoma NLRP3 não é importante para a indução dos mecanismos envolvidos na dor inflamatória, testamos outros importantes inflamassomas considerados chave nos mecanismos ativadores de caspase-1. Para isto, utilizamos animais geneticamente deficientes para: IPAF/NLRC4 e a molécula adaptadora ASC. Primeiramente, analisamos o limiar nociceptivo basal destes animais, os quais demonstraram não ser significativamente diferente do limiar basal de animais selvagens (Figura 5A). Por outro lado, a hiperalgesia inflamatória mecânica induzida por carragenina em animais selvagens foi reduzida em animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC em todos os tempos analisados (Figuras 5B e 5C, respectivamente).

Figura 5- Hiperalgesia mecânica nos animais geneticamente deficientes para IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. (A) Avaliação do limiar basal mecânico de animais WT, ASC^{-/-}, IPAF^{-/-} ou Salina. (B) Efeito hiperalgésico de animais WT, IPAF^{-/-} e Salina. (C) Efeito hiperalgésico de animais WT, ASC^{-/-} e Salina. Os tempos de avaliação foram 1, 3 e 5hr após a injeção de Cg (100 ug/pata). Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre os animais WT/Cg quando comparado com valor correspondente dos grupos de animais deficientes para IPAF/ASC.

4.4 Participação do inflamassoma IPAF(NLRC4) e da molécula adaptadora ASC na hiperalgesia inflamatória térmica.

Uma vez que a ausência dos componentes do inflamassoma (IPAF/NLRC4 e ASC) demonstrou perfil protetor para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória mecânica induzida pela carragenina, o próximo passo foi avaliar se o IPAF/NLRC4 e o ASC participavam do desenvolvimento da hiperalgesia térmica. O comportamento de resposta nociceptivo foi avaliado pela sensibilidade ao calor, gerada pela latência de retirada da pata do feixe de luz localizado pontualmente no centro do tecido plantar como descrito (HARGREAVES et al.,1988). O limiar nociceptivo térmico basal dos animais WT e deficientes para IPAF/NLRC4 e o ASC não foi significativamente diferente, representado por limiar basal (BL). No entanto, a hiperalgesia inflamatória térmica produzida pela injeção intraplantar de carragenina observado em animais WT, demonstrou-se reduzida nos animais deficientes para IPAF/NLRC4 e o ASC, principalmente no pico da hiperalgesia, ou seja, 3 h após a administração de carragenina (figura 6A e 6B), respectivamente.

Figura 6- Hiperálgisia térmica nos animais IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. (A) Avaliação do efeito hiperálgico térmico nos animais IPAF^{-/-} comparados aos animais WT ou salina. (B) Avaliação do efeito hiperálgico térmico nos animais ASC^{-/-} comparados aos animais WT ou salina. Os tempos de avaliação foram de 1, 3 e 5 após a injeção de Cg (100 ug/pata). BL representa o limiar basal antes de receberem o estímulo. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre os animais WT/Cg comparados aos animais deficientes para IPAF/ASC.

4.5 IPAF e ASC não contribuem para a produção periférica de citocinas pró-nociceptivas (TNF- α e CXCL1/KC) induzidas pela carragenina.

Sabendo que a liberação de TNF- α e CXCL1/KC no sítio inflamatório é importante para indução da hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, fomos investigar se o inflamassoma poderia modular o desenvolvimento da dor inflamatória via alteração na produção destas citocinas. A injeção de carragenina na pata de animais geneticamente deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC induziu níveis de TNF- α e CXCL1/KC semelhantes aos animais selvagens (Figuras 7A e 7B), respectivamente. Isto sugere que essa plataforma molecular (IPAF/NLRC4 e ASC) não são fatores cruciais na liberação do TNF- α e CXCL1/KC. Ou seja, o inflamassoma não participa da gênese da hiperalgesia inflamatória por alterar a produção das citocinas inflamatórias TNF- α e CXCL1/KC.

Figura 7 – Produção de citocinas em animais geneticamente deficientes para IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. (A) Animais WT ou salina e deficientes para IPAF/ASC receberam injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata) após 5 h, os níveis de TNF- α foram determinados por ELISA. (B) Animais WT ou salina e deficientes para IPAF/ASC receberam injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata) após 5 h, os níveis de CXCL1/KC foram determinados por ELISA. Os dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. de 5 animais por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos animais WT comparados aos animais deficientes para IPAF/ASC.

4.6 A migração de neutrófilos locais não estão comprometida nos animais deficientes para as proteínas IPAF(NLRC4) e molécula adaptadora ASC.

Além disso, as moléculas IPAF/NLRC4 e ASC demonstraram não contribuir no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório após a administração de carragenina (Figura 8). Isto sugere que a plataforma molecular composta pelo IPAF/NLRC4 e a molécula adaptadora ASC modula o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória por outro mecanismo que não a deficiência na produção de TNF- α e CXCL1/KC ou no recrutamento de neutrófilos.

Figura 8 – Recrutamento de neutrófilos quantificados no tecido. Animais WT ou salina e deficientes para IPAF/ASC receberam injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata). Após a 5 h de estímulo com Cg, a atividade de migração de neutrófilos foi determinada pela análise de MPO no tecido. Os dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. de 5 animais por grupo. Não houve diferença estatisticamente significante em relação aos animais WT comparados aos animais deficientes para IPAF/ASC.

4.7 PGE2 induz hiperalgesia mecânica em animais IPAF/NLRC4 e ASC de forma similar ao observado em animais selvagens.

Com o intuito de excluir a possibilidade de que a hiperalgesia inflamatória seja reduzida em animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC por uma deficiência em algum mecanismo importante para a montagem de uma resposta hiperalgésica, testamos a capacidade da PGE2, uma substância que sensibiliza diretamente os nociceptores, em produzir hiperalgesia em animais selvagens e deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC. Neste sentido, a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE2 (i.pl.) foi similar em intensidade e duração entre os animais deficientes para proteínas IPAF/NLRC4 E ASC quando comparados aos animais selvagens (Figura 9).

Figura 9 –Hiperlgesia mecânica induzida pela PGE2. Avaliação temporal do efeito demonstrando a hiperlgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE2 (100 ng/pata) entre os diferentes grupos. Os efeitos hiperalgésicos mecânicos foram avaliados nos tempos de 0.5, 1, 1.5 e 3 h após a injeção do estímulo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos comparado com o grupo salina.

4.8 Produção da IL-1 β ativa (*in vivo*) induzida pela carragenina é dependente de IPAF/NLRC4 e da molécula adaptadora ASC.

Um dos principais papéis do inflamassoma envolve a ativação de uma via de produção da IL-1 β na forma ativa. Visto que esta citocina é considerada fundamental na indução da hiperalgesia inflamatória, avaliamos se a proteção no desenvolvimento da dor inflamatória em animais deficientes para ASC e IPAF/NLRC4 poderia estar relacionada com redução na ativação da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Para isto, 5 horas após injeção de carragenina, o tecido plantar dos animais foram coletados e preparados para dosagem de citocinas no tecido e quantificados mediante a expressão da IL-1 β em suas duas formas: Pro-IL-1 β (inativa, 35 KDa) e IL-1 β (ativa, 17 KDa), pela técnica de imunoblot.

A administração intraplantar de carragenina induziu a liberação de IL-1 β semelhante nos animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC comparado aos animais selvagens, quando avaliados pelo método de ELISA (Figura 10). Por outro lado, as análises pelo imunoblot revelaram que a expressão de pro-IL1 β tanto em animais selvagens quanto em animais deficientes para IPAF/NLRC4, ASC e Caspase-1, foram semelhantes, sugerindo que os níveis detectados dosados pelo ELISA, certamente são provenientes da forma inativa da IL-1 β a (pro-IL1 β). Porém, somente em amostras de animais selvagens foi possível detectar a clivagem da pró-IL1 β em IL1 β ativa (Figura 11). Esse cenário esclarece o importante papel dos componentes do inflamassoma, na indução dos processos inflamatórios, bem como a produção da IL-1 β em suas duas formas apresentadas.

Figura 10 – Produção de IL-1 β total para o tecido em animais geneticamente deficientes para IPAF^{-/-} e ASC^{-/-}. Amostras do tecido plantar provenientes de animais WT ou salina e deficientes para IPAF/ASC após 5 hr da injeção intraplantar de Cg (100 ug/pata) foram coletados. Os níveis de IL-1 β foram determinados por ELISA. Os dados foram expressos como a média $\pm$ S.E.M. de 5 animais por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos testados.

Figura 11 - Expressão da pro-IL1 β e IL-1 β por imuno blot. Amostras do tecido plantar provenientes de animais WT ou Salina e animais deficientes para IPAF/ASC/Caspase-1 após 5 hrs da injeção de Cg (100 ug/pata) foram preparadas para as análises de imunoblot. Os níveis de proteínas foram determinados por separação de eletroforese (Western blot), da IL-1 β na sua forma biologicamente ativa (~17 KDa) e da pro-IL1 β (~35 KDa). As imagens demonstram a expressão de 3 amostras por grupos (WT/ASC/IPAF/Caspase1) e 2 amostras de salina.

4.9 Ativação de caspase-1 induzida por carragenina é dependente de IPAF(NLRC4) e da molécula adaptadora ASC.

Após verificar que a carragenina é capaz de induzir a produção de pro-IL1 β , que por sua vez depende dos inflamassomas IPAF/NLRC4 e ASC no processamento de IL-1 β , fomos investigar a participação na ativação da caspase1 neste modelo, visto que a caspase1 é o componente essencial regulatório na liberação de IL-1 β . Sabendo que a sua forma ativa tem a capacidade de clivar a pro-IL-1 β para posterior liberá-la no meio extracelular, quantificamos sua atividade por imunoblot as suas duas formas apresentadas: Caspase-1 na sua forma biologicamente ativa (~20 KDa) e da pro-Caspase-1 biologicamente inativa (~45 KDa). Como controle negativo foram utilizadas amostras coletadas de animais deficientes para caspase1^{-/-}. Já como controle positivo, utilizamos sobrenadante de macrófagos primados com LPS e ativados com nigericina (MARIATHASAN et al., 2006). Como pode ser observado, os animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC apresentam níveis de pro-caspase-1 semelhantes aos animais selvagens, após a administração de carragenina. Por outro lado, a carragenina foi capaz de induzir a ativação da caspase-1 apenas em animais selvagens, o que não foi observado em animais IPAF/NLRC4^{-/-} e ASC^{-/-} (Figura 12).

Figura 12 - Expressão da pro-Caspase-1 e Caspase-1 para o tecido. Amostras do tecido plantar provenientes de animais WT ou Salina e animais deficientes para IPAF/ASC/Caspase-1 após 5 hrs da injeção de Cg (100 ug/pata) foram preparadas para as análises de imunoblot. Os níveis de proteínas foram determinados por separação de eletroforese (Western blot), caspase-1 na sua forma biologicamente ativa (~20 KDa) e da pro-Caspase-1 (~45 KDa). O controle positivo (LPS+Nig) está representado por C+. As imagens demonstram a expressão de 3 amostras por grupo (WT/ASC/IPAF), 1 grupo salina e 1 grupo Caspase1^{-/-}.

4.10 Macrófagos estimulados *in vitro* com carragenina liberam IL-1 β .

Para elucidar os resultados encontrados *in vivo*, fomos investigar a participação do inflamassoma em um sistema isolado, macrófagos provenientes do peritônio de animais intactos foram removidos e estimulados com carragenina em meio de cultura. Inicialmente verificamos que a carragenina foi capaz de induzir a produção de IL-1 β (sobrenadante da cultura) em um efeito concentração-dependente, 4 horas após o estímulo (figuras 13A). Adicionalmente, identificamos que a carragenina também induz a liberação de TNF- α e KC/CXCL1 por macrófagos isolados do peritônio (figuras 13B e 13C).

Figura 13- Quantificação de citocinas pró-inflamatória em macrófagos. Cultura de macrófagos proveniente do peritônio de animais WT intactos . As células foram incubadas com Cg (30,100 e 300 ug/ml) ou meio durante 4 horas. Após a incubação o sobrenadante foi coletado e quantificado pelo ELISA. **(A)** Dosagem de IL-1 β após 4hr de estímulo **(B)** Dosagem de TNF- α após 4hr de estímulo. **(C)** Dosagem de KC/CXCL1 após 4hr de estímulo. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 4 poços de cultivo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante comparado ao grupo controle (meio).

4.11 Carragenina induz a ativação da caspase-1 em macrófagos isolados.

Neste momento considerando a carragenina como um agente indutor direto da liberação de IL-1 β , fomos avaliar a capacidade de ativação da caspase-1. Identificamos que a carragenina é capaz de ativar diretamente a caspase-1 (20 KDa), semelhante à ativação de LPS+Nigericina. (Figura 14). Macrófagos primados com LPS induzidos por nigericina foram utilizados para obtenção dos controles positivos (MARIATHASAN et al., 2006).

Figura 14 . Expressão da pro-Caspase-1 e Caspase-1 em macrófagos isolados.

Cultura de 1×10^6 macrófagos proveniente do peritônio de animais intactos WT, as células foram incubadas com Cg (100 e 300 ug/ml), LPS, LPS+Nig ou meio durante 4 horas. Os níveis de proteínas foram determinados por separação de eletroforese (Western blot), caspase-1 na sua forma biologicamente ativa (~20 KDa) e da pro-Caspase-1 (~45 KDa). As imagens demonstram a expressão de 3 amostras por grupo (Cg100, Cg300, LPS e LPS+Nig) e 1 grupo meio.

4.12 Liberação de IL-1 β em macrófagos são dependentes do inflamassoma IPAF(NLRC4), ASC e caspase-1.

Neste momento para reforçar nossos achados, avaliamos em um sistema isolado a capacidade dos inflamassomas ASC/IPAF/Caspase1 controlar os níveis extracelular de IL-1 β . Para confirmar nossa hipótese macrófagos provenientes do peritônio de animais selvagens intactos e geneticamente deficientes para IPAF/NLRC4, Caspase-1 e ASC foram isolados e estimulados com carragenina. A dosagem de citocinas no sobrenadante demonstrou níveis da IL-1 β reduzidos nos animais deficientes ASC/IPAF/Caspase1, comparados aos níveis dessa citocina nos animais selvagem, evidenciando o mecanismo pelo qual inicia-se o processo inflamatório induzido pela carragenina, culminando assim na liberação crucial de IL-1 β (figura 15).

Figura 15- Quantificação dos níveis de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos. Culturas de macrófagos provenientes do peritônio de animais WT intactos ou Meio e deficientes para IPAF/ASC/Caspase-1, foram estimuladas com Cg (300 ug/ml) durante 4 horas ou só meio. Após a incubação o sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de ELISA. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. de 4 poços de cultivo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa dos animais WT comparado aos animais deficientes para ASC/IPAF/Caspase1.

5. DISCUSSÃO

É bem determinado que a liberação de citocinas para o sítio inflamatório, além de seguir uma hierarquia sequencial de liberação também promove a indução da hiperalgesia inflamatória, por sensibilizar direta ou indiretamente as fibras sensoriais aferentes primárias. Nesse estudo avaliamos a participação do inflamassoma na cascata de eventos envolvidos na gênese da hiperalgesia inflamatória. Neste sentido identificamos que as plataformas moleculares IPAF/NLRC4 e ASC, mas não o NLRP3, regulam de maneira crucial o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória mecânica e térmica em camundongos. Além disso, a produção das citocinas TNF- α e CXCL1/KC, bem como o recrutamento de neutrófilos, parece ocorrer em um período anterior à ativação do inflamassoma, pois não foram observadas diferenças nos níveis dessas citocinas e nem na migração de neutrófilos para o tecido plantar dos animais selvagens comparados aos animais deficientes para IPAF/ASC/NLRP3. Não obstante, esse estudo avança nos mecanismos da gênese da dor inflamatória via inflamassoma, pois dados recentes do nosso grupo reforçam a importante participação da ativação da caspase-1 e consequente liberação de IL-1 β no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 2010). Além disso, outras doenças inflamatórias como a síndrome da dor regional complexa tipo I (CRPS1), a qual é desencadeada pela sensibilização nociceptiva neural crônica, demonstra ser dependente do processamento de IL-18, IL-1 β e caspase-1 (SARANGI et al., 1993; LI et al., 2009).

Atualmente, descreve-se que o mecanismo de ativação e liberação de IL-1 β requer dois sinais extracelulares distintos (BURNS, MARTINON, TSCHOPP, 2003). O primeiro sinal é disparado pela síntese da pró-IL-1 β via ativação de receptores de reconhecimento padrão (ex. TLRs). O segundo sinal induz a conversão da pro-IL1 β (biologicamente inativa) em IL-1 β (biologicamente ativa) pela caspase-1. Neste evento, o segundo sinal ativaria um complexo citoplasmático, o inflamassoma, na qual

subsequentemente ativaria a enzima caspase-1. Curiosamente em nosso estudo a carragenina demonstra ativar a caspase1 independente de um segundo sinal, como observado, a carragenina por si só já foi capaz de realizar as duas ações conjunta, tanto sintetizando a pro-IL1 β como ativando a caspase1. Isso foi melhor esclarecido ao avaliar a capacidade da carragenina em ativar a caspase-1, em cultura de macrófagos, de forma semelhante ao estímulo LPS+Nigericina.

Para ativar o inflamassoma os primeiros estudos sugeriram a necessidade de um segundo sinal, o efluxo de potássio tem sido descrito por ativar o inflamassoma NLRP3. Quando esse efluxo é bloqueado aumentando-se concentração extracelular de K⁺, a ativação do inflamassoma NLRP3 é abolida (PETRILLI et al., 2007). Por outro lado, existem evidências que o ATP extracelular também pode agir como indutor deste processo visto que este é capaz de ativar receptores do tipo P2X7, os quais por sua vez recrutam canais celulares permitindo assim o efluxo de K⁺. Ainda, algumas toxinas bacterianas (como a nigericina) poderiam também agir como o segundo sinal, pois induzem a formação de poros na membrana celular, provocando o efluxo de K⁺ (MARIATHASAN et al.,2006). Logo, a ativação da caspase-1 e subsequente clivagem de pro-IL-1 β pode derivar tanto da ativação de receptores purinérgicos quanto por moléculas indutoras de formação de poros na membrana celular (HOGQUIST et al.,1991).

Em condições patológicas o ATP pode ser liberado por células do sistema imune para agir como um sinal de perigo pró-inflamatório. Nesse intuito, estudos reforçam que a subunidade do receptor P2X7 (P2X7R), talvez o mais estudado, é predominantemente expressa em células do sistema imunológico, no qual desenvolve importante participação nos processos de dor e hiperalgesia (DELL'ANTONIO et al., 2002a,b ; DONNELLY-ROBERTS e JARVIS, 2007; FULGENZI et al., 2005; FULGENZI

et al., 2008; HONORE et al., 2009; LISTER et al., 2007; MCGARAUGHTY et al., 2007). Esses parâmetros podem ser associados a diversas funções, na qual o ATP desencadeia uma série de respostas celulares, tais como permeabilização da membrana, ativação da caspase, liberação de citocinas inflamatórias, proliferação celular e apoptose, o que demonstra um papel real para este tipo de receptor P2X7 em doenças inflamatórias (BARALDI et al., 2003; NORTE, 2002). Nosso grupo investigou algumas evidências descritas na literatura e confirmou que macrófagos isolados provenientes do peritônio de animais selvagens intactos *in vitro* estimulados com carragenina liberam ATP no sobrenadante de cultura (Dados não mostrados).

Tendo em vista esta abordagem, o inflamassoma NLRP3 pode ser ativado via canal P2X7 pelas altas concentrações de ATP extracelular (eATP) (IYER et al., 2009). Dois importantes mecanismos recentes são bem descritos na literatura para ativação do inflamassoma NLRP3: 1-ruptura da membrana plasmática (por toxina bacteriana e ATP); 2-internalização de nanopartículas ativadoras pela fagocitose (CASSEL et al., 2009). Como consequência, o eATP ou as toxinas bacterianas levam ao efluxo de K^+ , e a formação de poros na membrana (PELEGRIN e SURPRENANT, 2007). Conhecendo a íntima relação do eATP e a participação do inflamassoma NLRP3, hipotetizamos que essa plataforma molecular mediada pelo NLRP3 seria chave na regulação da indução da dor inflamatória, aspecto este que intrigou o início de nossa investigação. Reforçando nossa ideia primária, outros estudos demonstraram que o inibidor irreversível do P2X7R o oATP (DI VIRGILIO, 2003) ou o antagonista seletivo do (P2X7R) A-438079 reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina no tecido subcutâneo da pata de ratos (HONORE et al., 2006; MCGARAUGHTY et al., 2007).

Decidimos então investigar inicialmente a participação do inflamassoma NLRP3, após indução de carragenina. Para isso utilizamos animais deficientes para NLRP3 e de maneira surpreendente observamos que a carragenina induziu hiperalgesia mecânica, máxima na 3hr de avaliação, nos animais selvagens (WT) resposta foi semelhante a encontrada nos animais deficientes para NLRP3. Demonstramos também que o inflamassoma NLRP3 não participa do recrutamento de neutrófilos para o local e nem no controle dos níveis de IL-1 β , pois não houve diferenças desses parâmetros entre os animais selvagens e nos animais deficientes para NLRP3, confirmando que o inflamassoma NLRP3, no nosso modelo experimental, não participa dos mecanismos moduladores da hiperalgesia. Paralelo a isso, utilizamos animais deficientes para IL-1 β como controle negativo, visto que é uma citocina intermediária importante no processo de indução da hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 2005).

Esses fatos intrigantes permitiram ampliar nossa investigação, acerca de outros sinalizadores moleculares. Nesse sentido, outros NLRs poderiam estar envolvidos na ativação de caspase-1, incluindo IPAF (NLRC4, CARD12), que desempenha diversas funções para responder a uma variedade de estímulos diferentes após uma infecção por patógenos microbianos. Por exemplo, a *Salmonella typhimurium* (MARIATHASAN et al., 2004), *Shigella flexneri* (SUZUKI et al., 2007), e *Pseudomonas aeruginosa* (FRANCHI et al., 2007; MIAO et al., 2008; SUTTERWALA et al., 2007) tem sido descrita por ativarem caspase-1, por uma via dependente de IPAF (POYET et al., 2001). Levando em consideração outros aspectos na ativação da caspase-1 pelas proteínas do grupo NLRP é conhecido que elas requerem uma proteína adaptadora (ASC) capaz de interagir com a família dos NLRP e caspase-1 (MARTINON et al., 2007).

Com base nessas evidências acerca da participação de outros sensores citosólicos, componentes importantes para regular a ativação de caspase-1, fomos avaliar a participação dos inflamassomas IPAF/NLRC4 e da molécula adaptadora ASC na indução da hiperálgesia inflamatória. De maneira surpreendente e positiva, identificamos que as moléculas IPAF/NLRC4 e ASC, regulam o desenvolvimento da hiperálgesia inflamatória mecânica e térmica, principalmente, por controlar a ativação de caspase-1 e consequentemente a liberação de IL-1 β para o sítio inflamatório. Estas conclusões são baseadas pelo fato de que animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC, após indução do processo inflamatório por carragenina *in vivo*, apresentaram incapacidade de clivar a pro-IL-1 β em IL-1 β , pelo fato de observar deficiência na ativação da caspase-1, visto que foi observado menor expressão da caspase-1 ativa (~20 KDa) no tecido. Outro dado interessante foi que os níveis totais de IL-1 β quantificados no tecido não foram diferentes entre os animais selvagens comparados aos animais deficientes para IPAF/ASC, resultado este que foi esclarecido após demonstramos que os níveis totais de IL-1 β representam a subunidade da pro-IL-1 β (~35 KDa), pois a expressão da sua forma inativa estavam inalteradas entre os diferentes grupos. Além disso reforçando os dados encontrados *in vivo*, observamos que em macrófagos isolados estimulados com carragenina, apresentaram níveis reduzidos de IL-1 β , que por sua vez foram controlados pelos inflamassomas IPAF, ASC e Caspase-1.

Dados da literatura demonstraram que existem 14 proteínas que compõem a família dos NLRP em camundongos, sendo que seus ativadores em sua maioria ainda permanecem desconhecidos (HALLE et al., 2008; KANNEGANTI et al., 2006; MARIATHASAN et al., 2004; MARTINON et al., 2004; MARTINON et al., 2006; PETRILLI et al., 2007; SUTTERWALA et al., 2006). Somado a essa complexidade no

entendimento dos mecanismos que envolvem os inflamassomas, investigações recentes demonstraram dados controversos, acerca do inflamassoma NLRP3, até o momento considerado bem conhecido. Por exemplo, em um estudo *in vitro* macrófagos isolados provenientes de animais deficientes para NLRP3^{-/-} foram estimulados por *L. pneumophila*, curiosamente os níveis de IL-1 β não foram reduzidos quando comparados com macrófagos provenientes de animais selvagens, sugerindo que o inflamassoma NLRP3 não foi dependente da ativação ASC/Caspase-1 para secretar IL-1 β e também não é a única família dos NLRP que são capazes de regular doenças inflamatórias (CASE et al., 2009). Assim, é possível que a via mediada por ASC e Caspase-1 ativado por *L. pneumophila* representa um mecanismo que é diferente da via de NLRP3. Consistente com nossos achados, esses dados demonstram semelhanças nas respostas encontradas no nosso estudo, na qual o inflamassoma NLRP3 não participa no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Por outro lado, entendemos então que nossos dados são sólidos ao observar que foi possível caracterizar, de forma crucial os inflamassomas ASC/IPAF, mas não NLRP3. As observações supracitadas, evidenciam que a presença de múltiplas famílias de NLRPs confere uma diversidade nas respostas encontradas, pois podem ser gerados uma multiplicidade de sinais a partir de um único estímulo.

Nosso grupo tem demonstrado que além das citocinas de alarme atuarem na sensibilização dos nociceptores causando dor, o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório também é importante (CUNHA et al., 2008). No entanto, parece que o complexo inflamassoma não é dependente do recrutamento de neutrófilos neste modelo inflamatório com carragenina, baseado nos resultados obtidos, o acúmulo de neutrófilos para o tecido plantar de animais deficientes para IPAF/ASC/NLRP3 foram semelhantes quando comparados aos animais selvagens. Sabe-se que existe uma

interação do recrutamento dos neutrófilos para o local da inflamação, com as células residentes, mediadores locais inflamatórios, matriz extracelular que pode levar à produção de vários outros mediadores, incluindo citocinas/quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e metaloproteases que podem ainda amplificar a resposta inflamatória e causar danos teciduais (KASAMA et al., 2005; PALMER 2006; EYLES et al., 2006). Por exemplo, existem evidências que a pro-IL-1 β pode ser induzida por uma classe de proteases relacionadas às elastases, tais como as metaloproteases de matriz 9 (MMP9), que por sua vez podem ser produzidas após o recrutamento de neutrófilos para os locais da lesão tecidual (JOOSTEN et al., 2009 ; KAWASAKI et al., 2008).

Nessa abordagem, tem sido demonstrado recentemente que MMP9 medeia o cenário hiperalgésico no desenvolvimento da artrite induzida por antígeno, em um modelo de estudo, que a citocina IL-1 β desempenha um papel essencial (PINTO et al., 2010). O recrutamento de neutrófilos a partir de mediadores químicos podem também contribuir para a formação de edema, febre, e produção de proteínas de fase aguda inflamatória (WEDMORE et al., 1981; GORDON et al., 2005). Evidências indiretas apontam o envolvimento de neutrófilos na hiperalgesia inflamatória, após indução com zimosan, demonstrando que a incapacidade do movimento articular foi reduzida pelo inibidor da síntese de leucotrienos (LT), que por sua vez, também diminuiu o acúmulo de neutrófilos para as articulações (DA ROCHA et al., 2004).

Embora estes estudos propostos esclarecem o envolvimento dos neutrófilos nos processos nociceptivos, a inibição da migração de leucócitos, pode reduzir de maneira dose-dependente a hiperalgesia mecânica, contudo não são capazes de inibir a produção e liberação de citocinas, incluindo o TNF- α , IL-1 β , e quimiocinas, *in vitro* e *in vivo* (CASSATELLA et al., 1995; KASAMA et al., 2005; MITRA et al., 2006; RITTNER et al., 2006). Outras evidências, reforçam a idéia de que o aumento da produção de

citocinas para o tecido plantar de ratos foi independente da migração de neutrófilos. Corroborando com nossos resultados, no qual encontramos nos animais deficientes para ASC/IPAF níveis das citocinas (TNF- α e CXCL1) inalterados quando comparados com animais selvagens, ou seja, a liberação de citocinas pró-inflamatórias não é fator determinante para o recrutamento de neutrófilos para o local e nem participam dos mecanismos envolvidos na regulação do inflamassoma. Outro dado investigado nesse trabalho esclarece o por que ao utilizar animais deficientes para IL-1 β induzidos com carragenina intraplantar o recrutamento de neutrófilos permanece inalterado (dados não mostrados). Sendo assim, é provável que as citocinas (TNF- α , IL-1 β , CINC-1/CXCL1) envolvidas no processo de hiperalgesia podem ser liberadas por células residentes, diferentes de neutrófilos, tais como os macrófagos, mastócitos e fibroblastos (CUNHA et al., 2008).

É importante mencionar, entretanto que os neutrófilos podem ser responsáveis pela a liberação de citocinas pro-nociceptivas em outros modelos de inflamação. Nesse contexto, a depleção de neutrófilos em ratos impediu o aumento dos níveis de IL-1 β para o tecido plantar estimuladas com CFA (RITTNER et al., 2006). A diferença nos modelos experimentais, talvez explique em partes, a aparente contradição. Consideramos que ao analisar o recrutamento de neutrófilos para o sitio inflamatório, seja um importante parâmetro inflamatório de grande relevância, embora não seja regulado pelos inflamassoma ASC/IPAF/NLRP3.

A carragenina é muito utilizada em modelos experimentais de doenças inflamatórias devido a sua intensa capacidade de induzir inflamação local. Uma procura simples na base de dados do ncbi/pubmed com as seguintes palavras chave: carrageenan-induced pain revelou que até o momento existem 799 artigos que utilizaram este composto como agente indutor de dor inflamatória, talvez sem um real

conhecimento sobre seu mecanismo de ação (Referência: 31/01/2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=carrageenan-induced%20pain>).

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado com massa molecular relativa acima de 100 kDa, derivado de algas marinhas vermelha da classe *Rhodophyceae* (USOV et al., 2002). A carragenina não tem valor nutritivo, contudo tem sido largamente utilizada na preparação de alimentos durante séculos. Apresentam propriedades de gelificação, espessamento, emulsificantes, estabilização de proteínas, suspensão de partículas, e retenção de água, essas características contribuem para textura e solubilização de alimentos processados.

Tendo em vista a ampla variedade do seu emprego, renderam a carragenina a patente como um aditivo alimentar para uso humano, na América do Norte, na década de 1930. Três principais tipos de carragenina são utilizados comercialmente, conhecidos na indústria alimentar como iota, kappa e lambda. Estes nomes não refletem a estrutura química definitiva, mas apenas diferenças gerais na composição e grau de sulfatação em locais específicos no polímero. Esse polissacarídeo sulfatado historicamente tem longa utilização como aditivo alimentar na dieta ocidental (IMESON, 2000; TOBACMAN, 2001). Além disso, o seu consumo é cada vez maior e frequente nas últimas décadas (SOMOGYI et al., 2005; TOBACMAN et al., 2001).

Durante a segunda metade do século XX, doenças inflamatórias e crônicas gastrointestinais podem ter sido importantes causas de morbidade e mortalidade na América do Norte. A dieta ocidental tem sido considerada a possível origem dessas doenças (RIES et al., 1999 ; SCHOTTENFELD, WINAWER, 1996; SCHATZKIN, 2000). Esse cenário ganhou importância à medida que a participação da carragenina na dieta humana foi aumentando, sendo assim potenciais efeitos crônicos mediante a sua utilização começaram a surgir.

Diversos grupos têm sugerido que o uso crônico da carragenina pode estar associado diretamente à gênese de neoplasias intestinais e ulcerações. No entanto, ela continua sendo empregada como aditivo alimentar. Mesmo sem terem completos esclarecimentos acerca dos mecanismos de indução do processo inflamatório por este polissarídeo (MARCUS, WATT, 1980; MARCUS, WATT, 1981; MARCUS, 1980; EKSTROM et al., 1983; EKSTROM, 1985).

Neste contexto, o nosso grupo identificou que durante o processo inflamatório, a carragenina causa hiperalgesia mecânica precedida pela liberação sequencial de citocinas, mediado pelas células residentes ou pelas que foram recrutadas para o local da injúria (CUNHA et al., 2005). Esse cenário proporcionou avançar no entendimento da hierarquia dos processos nociceptivos inflamatórios, utilizando o modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina. Foi demonstrado que, o TNF- α e o CXCL1/KC, são liberados em um primeiro momento após a administração do estímulo, os quais foram capazes de induzir IL-1 β , que por sua vez é responsável pela estimulação da síntese de prostaglandinas e consequente liberação de aminas simpaticomimética (CUNHA et al., 2005).

Existe um crescente corpo de evidências que os polissacarídeos derivados de algas marinhas podem regular a resposta imune inata diretamente através da ligação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como os receptores de Manose e do tipo Toll-like em células fagocíticas, incluindo macrófagos. De fato, testamos em macrófagos isolados se a carragenina estava ativando receptores extracelulares ou se era necessário ser fagocitada para exercer seu papel na ativação do inflamassoma, utilizamos um inibidor da polimerização dos filamentos de actina e observamos que a carragenina parece atuar por um mecanismo via ativação de receptores de membrana, até o momento não bem descrito (dados não mostrados).

Outros indícios demonstram que em cultura de células isoladas, a λ -carragenina pode estimular a produção de citocinas (ex. IFN- γ) parcialmente via ativação de TLR4 (TSUJI et al., 2003). Esses indícios podem explicar como a carragenina poderia estar induzindo a produção de pro-IL1 β . Por outro lado existe a possibilidade da carragenina ser endocitada e transportada para os fagolisossomos da mesma maneira como ocorre com outros polissacarídeos (COHN et al., 1969). Uma vez capturada pelo fagolisossomo, devido a sua estrutura original que é resistente à digestão, ocorre um inchaço lisossomal seguido da ruptura da membrana e, com consequência a liberação de carragenina e hidrolases lisossômicas no citoplasma da célula (PHILLIP et al., 1971). Seria sugestivo então que o inflamassoma IPAF/NLRC4 poderia estar sendo ativado por um mecanismo semelhante a endocitose da carragenina, seguida da liberação de seu conteúdo intracelular.

Recentemente, foi identificado outro mecanismo pelo qual a carragenina do tipo lambda induz inflamação, nesse contexto foi observado que a ativação de NF-kappa B é necessária para liberar IL-8 e CXCL1 em células epiteliais intestinais humana (IEC) mediada pela participação de Bcl10 (*B-cell chronic lymphocytic leukemia*) (BORTHAKUR et al., 2007). O envolvimento de células B de linfoma / leucemia (Bcl) -10 na ativação de NF-kappa B foi bem estabelecido em linfócitos e macrófagos, associados com a ativação constitutiva de NF-kappa B na MALT (tumor linfoide associado a mucosa) (SUN et al., 2004 ; ZHANG et al., 1999; WILLIS et al., 1999; WU et al., 2008; ZHOU et al., 2004). Além disso, existem fortes indícios que o BCL10, contém um domínio de oligomerização de nucleótido 2 (NOD2) e um outro domínio de recrutamento de caspase (CARD) que está associado a predisposição genética para a doença de Crohn, sugerindo uma possível ligação com o complexo multiprotéico inflamassoma. Outros estudos têm demonstrado que Bcl10 é um

mediador essencial na ativação por LPS, carragenina e pelo fator de ativação de plaquetas (PAF) induzida por inflamação do cólon em células epiteliais humanos (BORTHAKUR et al., 2007; BORTHAKUR et al., 2009). Diferentes dados, acerca da real ativação da carragenina ainda não esclarecem totalmente como ela pode estar ativando o inflamassoma, contudo em nosso estudo parece ser via receptor de membrana (dados não mostrados). Este conjunto de evidências fortalece o papel da carragenina na ativação do inflamassoma, principalmente os dados encontrados nesse trabalho que demonstram que é via dependente do inflamassoma IPAF/NLRC4 e ASC, sendo assim além do inflamassoma atuar como vigilantes citosólicos frente ao reconhecimento bacteriano, ele também está envolvido em processos inflamatórios estéreis.

Os dados desse trabalho estão de acordo com as recentes evidências do nosso grupo, na qual evidenciou a participação da caspase-1 nos mecanismos da hiperalgesia inflamatória, foi demonstrado que o inibidor seletivo da caspase-1 reduziu o comportamento hiperalgésico em animais selvagens (CUNHA et al., 2010). Esses resultados ainda, corroboram com conclusões anterior de ELFORD et al., (1995), que demonstrou que o tratamento com um inibidor seletivo da caspase-1, em ratos, apresentam menores respostas na hiperalgesia mecânica em um modelo de inflamação. Estendendo estas observações, foi recentemente mostrado que a fratura da tíbia em ratos induz a ativação do inflamassoma NALP1 levando a excessiva expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, que por sua vez contribuem para a sensibilização nociceptiva local. Por outro lado, nosso grupo demonstrou que a citocina IL-18 não é fator preponderante no controle da hiperalgesia inflamatória via ativação da caspase-1 (CUNHA et al., 2010).

Vale dizer então que, existe a participação crucial do inflamassoma IPAF/NLRC4 e ASC na modulação da hiperalgesia inflamatória. Contudo, não está associado com a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e CXCL1/KC), nem com o recrutamento de neutrófilos, mas tem papel fundamental na ativação da caspase-1 no sítio inflamatório. A ativação da caspase-1 leva à maturação local da IL-1 β e consequentemente à indução da COX-2 e produção de PGE2, considerado um mediador nociceptivo final essencial da hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 2010). Corroborando com esses dados, nossos resultados demonstraram de fato que ao fornecer mediadores finais da hiperalgesia inflamatória (PGE2) os animais deficientes para IPAF/NLRC4 e ASC, desenvolvem um quadro hiperalgésico semelhante aos animais selvagens, confirmando o papel desse mediador na sensibilização das fibras aferentes primárias periféricas, somando assim no entendimento dos mecanismos que envolvem o inflamassoma (IPAF/NLRC4 e ASC) que parece modular via acima a esse mediador. Indubitavelmente, de maneira pioneira e inovadora todos os resultados do presente trabalho agregam novas informações acerca de um possível alvo real para controlar a dor inflamatória via inibição do inflamassoma NLRC4/ASC/Caspase-1.

6. CONCLUSÃO

Este estudo identificou um novo mecanismo importante na hiperalgesia inflamatória, o qual modula de forma dependente de caspase-1 o processamento de IL-1 β . A ativação do inflamassoma (IPAF e ASC), mas não o NLRP3, participa no controle final de ativação da caspase-1 e produção da interleucina (IL)-1 β induzida pela carragenina, controlando assim o desenvolvimento da dor inflamatória.

7. Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AMER, A., FRANCHI, L., KANNEGANTI, T. D., BODY-MALAPEL, M., OZOREN, N., BRADY, G., MESHINCHI, S., JAGIRDAR, R., GEWIRTZ, A., AKIRA, S., AND NUNEZ, G. (2006). Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* 281, 35217–35223.

AREND WP, EVANS CH (2003). Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In: Thomson AW, Lotze MT, eds. *The Cytokine Handbook*, 4th edn. London, UK: Elsevier: 669–708.

BARALDI, P.G., DEL CARMEN NUNEZ, M., MORELLI, A., FALZONI, S., DI VIRGILIO, F., ROMAGNOLI, R. (2003). Synthesis and biological activity of N-arylpiperazine-modified analogues of KN-62, a potent antagonist of the purinergic P2X7 receptor. *J. Med. Chem.* 46, 1318–1329.

BECKER CE, CREAGH EM, O'NEILL LA (2009). Rab39 a binds caspase-1 and is required for caspase-1-dependent interleukin-1 β secretion. *Biol Chem.* 284 (50):34531–34537.

BONICA, J.J (1990). *The Management of Pain*. Philadelphia: W.B. Saunders & Co.

BORTHAKUR A, BHATTACHARYYA S, DUDEJA PK, TOBACMAN JK. (2007). Carrageenan induces Interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 292:G829–G838.

BURNS K, F. MARTINON, J. TSCHOPP (2003). New insights into the mechanism of IL-1 beta maturation, *Curr. Opin. Immunol.* 15 26 e30.

CASE, C. L., SHIN, S., AND ROY, C. R (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 77, 1981–1991.

CASSEL SL, JOLY S, SUTTERWALA FS. (2009). The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. *Semin Immunol*; 21: 194–198.

CASSATELLA, M. A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., MCDONALD, P. P., TRINCHIERI, G. (1995). Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-. *Biochem. J.* 310, 751–755.

CERRETTI, D. P., KOZLOSKY, C. J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K., GREENSTREET, T. A., MARCH, C. J., KRONHEIM, S. R., DRUCK, T., CANNIZZARO, L. A., et al., (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 257, 97-100.

COHN ZA, EHRENREICH BA (1969). The uptake, storage, and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. *J Exp Med* 129:201-218.

CUNHA F Q, LORENZETTI BB, POOLE S, & FERREIRA SH (1991). Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 104, 765-7.

CUNHA JM, CUNHA FQ, POOLE S, FERREIRA SH (2000). Br J Pharmacol. July; 130(6): 1418–1424. doi: 10.1038/sj.bjp.0703434.

CUNHA, J. M., SACHS, D., CANETTI, C. A., POOLE, S., FERREIRA, S. H., & CUNHA, F. Q (2003). The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. Br J Pharmacol, 139(6),1135–1145.

CUNHA TM, VERRI JR WA, VIVANCOS GG, MOREIRA IF, REIS S, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. Braz J Med Biol Res.; 37: 401-7

CUNHA TM, VERRI JR WA, SILVA JS, POOLE S, CUNHA FQ, FERREIRA SH (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci.; 102: 1755-60

CUNHA TM, VERRI WA JR, SCHIVO IR, NAPIMOGA MH, PARADA CA, POOLE S, et al., (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. J Leukoc Biol, 83:824-832.

CUNHA, TM ; TALBOT, J; PINTO, LG; VIEIRA, SM ; SOUZA, GUILHERME R ; GUERRERO, AT ; SONEGO, F ; VERRI, WA ; ZAMBONI, DS ; FERREIRA, SH ;CUNHA, FQ (2010). Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1b maturation. Molecular Pain, v. 6, p. 63.

DA ROCHA, F. A., TEIXEIRA, M. M., ROCHA, J. C., GIRAO, V. C., BEZERRA, M. M., RIBEIRO RDE, A., CUNHA F, Q. (2004). Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *Eur.J. Pharmacol.* 497, 81–86.

DELL'ANTONIO, G., QUATTRINI, A., CIN, E.D., FULGENZI, A., FERRERO, M.E., (2002a). Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum.* 46, 3378–3385.

DELL'ANTONIO, G., QUATTRINI, A., DAL CIN, E., FULGENZI, A., FERRERO, M.E., (2002b). Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci. Lett.* 327, 87–90.

DINARELLO CA (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med.* Nov 29;311(22):1413–1418.

DINARELLO CA, CANNON JG, WOLFF SM, BERNHEIM HA, BEUTLER B, CERAMI A, FIGARI IS, PALLADINO MA JR, O'CONNOR JV (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med.* 163, 1443-1450.

DINARELLO CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*; 87:2095–2147.

DI VIRGILIO F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28: 465–472.

DONNELLY-ROBERTS, D.L., JARVIS, M.F (2007). Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br. J. Pharmacol.* 151, 571–579.

ELFORD PR, HENG R, REVESZ L, MACKENZIE AR (1995). Reduction of inflammation and pyrexia in the rat by oral administration of SDZ 224-015, an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Br J Pharmacol*, 115:601-606.

ENGEL, G. L. (1975). Dor. In MacBryde. *Sinais e sintomas* (5^a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

EYLES, J. L., ROBERTS, A. W., METCALF, D., WICKS, I. P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2, 500–510.

EKSTROM LG, KUIVINEN J, JOHANSSON G. (1983). Molecular weight distribution and hydrolysis behavior of carrageenans. *Carbohydr Res* 116 :89–94

EKSTROM LG. (1985). Molecular weight distribution and the behavior of kappa-carrageenan on hydrolysis. *Carbohydr Res* 135:283–289.

FERREIRA, S.H. (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* 240, 200-3.

FERREIRA SH, NAKAMURA M, & DE ABREU CASTRO MS (1978). The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 16, 31-7.

FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M. (1979). I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins* 18, 179-90.

FERREIRA SH (1983). Prostaglandins, peripheral and central analgesia. In: J.J. Bonica (ed): *Advances in pain research and therapy*. Raven Press, New York, 5: 627-634.

FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., BRISTOW, A. F. & POOLE, S. (1988). *Nature* 334,689–700.

FERREIRA SH, ROMITELLI M, & DE NUCCI G (1989). Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5, S220-2.

FOLLENFANT RL, NAKAMURA-CRAIG M, HENDERSON B, HIGGS GA (1989). Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 beta-induced, prostaglandin-independent hyperalgesia. *Br J Pharmacol.*, 98, 41-3.

FULGENZI, A., DELL'ANTONIO, G., FOGLIENI, C., DAL CIN, E., TICOZZI, P., FRANZONE, J.S., FERRERO,M.E (2005). Inhibition of chemokine expression in rat inflamed paws by systemic use of the antihyperalgesic oxidized ATP. *BMC Immunol.* 6, 18.

FRANCHI, L., AMER, A., BODY-MALAPEL, M.,KANNEGANTI, T. D., OZOREN, N., JAGIRDAR, R., INOHARA, N., VANDENABEELE, P.,BERTIN, J., COYLE, A., GRANT, E. P., AND NUNEZ, G (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-

1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* 7, 576–582.

FRANCHI, L., J. STOOLMAN, T. D. KANNEGANTI, A. VERMA, R. RAMPHAL, AND G. NUNEZ. (2007). Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur. J. Immunol.* 37: 3030–3039.

FRANCHI L, N. WARNER, K. VIANI, G. NUNEZ (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227 106 e 128.

GOLDBLUM SE, YONEDA K, COHEN DA, MCCLAIN CJ (1988). Provocation of pulmonary vascular endothelial injury in rabbits by human recombinant interleukin-1 beta. *Infect Immun*; 56:2255-2263.

GORDON, J. R., LI, F., ZHANG, X., WANG, W., ZHAO, X., NAYYAR, A. (2005). The combined CXCR1/CXCR2 antagonist CXCL8(3-74)K11R/G31P blocks neutrophil infiltration, pyrexia, and pulmonary vascular pathology in endotoxemic animals. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1265–1272.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L (2006). The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biological Research Nursing*, v.7, n.4, p.297-312.

HALLE, A., HORNUNG, V., PETZOLD, G.C., STEWART, C.R., MONKS, B.G., REINHECKEL, T., FITZGERALD, K.A., LATZ, E., MOORE, K.J., AND GOLENBOCK,

D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9, 857–865.

HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, FLORES C, JORIS J (1988). *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.* *Pain.* Jan;32(1):77-88.

HONORE, P., DONNELLY-ROBERTS, D., NAMOVIC, M.T., HSIEH, G., ZHU, C.Z., MIKUSA, J.P., HERNANDEZ, G., ZHONG, C., GAUVIN, D.M., CHANDRAN, P., HARRIS, R., MEDRANO, A.P., CARROLL, et al., (2006). A-740003 [N-(1-[[[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino]-2, 2-dimethylpropyl]-2-(3, 4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1376–1385.

HONORE, P., DONNELLY-ROBERTS, D., NAMOVIC, M., ZHONG, C., WADE, C., CHANDRAN, P., ZHU, C., CARROLL, W., PEREZ-MEDRANO, A., IWAKURA, Y., JARVIS, M.F (2009). The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1 α knockout mice. *Behav. Brain Res.* 204, 77–81.

HOGQUIST K.A., M.A. NETT, E.R. UNANUE, D.D. CHAPLIN (1991). Interleukin 1 is processed and released during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 8485–8489.

IMESON AP. (2000). Carrageenan, chapter 5. In: Phillips GO, Williams PO, editors. Handbook of hydrocolloids. Cambridge (England): Woodhead Publishing Limited; p. 87–102.

INOHARA, N., NUNEZ, G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 5, 371-82.

INOHARA, CHAMAILLARD, MCDONALD, C., NUNEZ, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 355-83.

IYER SS, PULSKENS WP, SADLER JJ, BUTTER LM, TESKE GJ, ULLAND TK et al., (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20388–20393.

JOOSTEN LA, NETEA MG, FANTUZZI G, KOENDERS MI, HELSEN MM, SPARRER H, et al., (2009). Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* , 60 : 3651-3662.

JULIUS, D., BASBAUM, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-10.

KANNEGANTI, T.D., BODY-MALAPEL, M., AMER, A., PARK, J.H., WHITFIELD, J., FRANCHI, L., TARAPOREWALA, Z.F., MILLER, D., PATTON, J.T., INOHARA, N.,

AND NUNEZ, G. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 281, 36560–36568.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM (2000). The perception of pain. In: *Principles of Neural Science*. 4^a ed. EUA: MacGraw-Hill. Cap. 24, p. 472-491.

KASAMA, T., MIWA, Y., ISOZAKI, T., ODAI, T., ADACHI, M., KUNKEL, S. L. (2005). Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 273–279.

KAWASAKI Y, XU ZZ, WANG X, PARK JY, ZHUANG ZY, TAN PH, et al., (2008). Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*, 14:331

KHASAR, S.G., LIN, Y.H., MARTIN, A., DADGAR, J., MCMAHON, T., WANG, D., HUNDLE, B., ALEY, K.O., ISENBERG, W., MCCARTER, G., GREEN, P.G., HODGE, C.W., LEVINE, J.D., MESSING, R.O. (1999). A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* 24, 253-60.

LAMKANFI M, KANNEGANTI TD, FRANCHI L, NÚÑEZ G. J (2007). *Leukoc Biol.* 2007 Aug; 82(2):220-5.

LAMKANFI M, DIXIT VM (2009). The Inflammasomes. *PLoS Pathog* 5(12): e1000510. doi:10.1371 / journal.ppat.1000510

LI WW, GUO TZ, LIANG D, SHI X, WEI T, KINGERY WS, et al., (2009). The NALP1 inflammasome controls cytokine production and nociception in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain*, 147:277-286.

LIGHTFIELD, K. L., PERSSON, J., BRUBAKER, S. W., WITTE, C. E., VON MOLTKE, J., DUNIPACE, E. A., HENRY, T., SUN, Y. H., CADO, D., DIETRICH, W. F., MONACK, D. M., TSOLIS, R. M., AND VANCE, R. E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxyterminal domain of flagellin. *Nat. Immunol.* 9, 1171–1178.

LISTER, M.F., SHARKEY, J., SAWATZKY, D.A., HODGKISS, J.P., DAVIDSON, D.J., ROSSI, A.G., FINLAYSON, K., (2007). The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J. Inflamm. (Lond.)* 4, 5.

LOESER, JD & MELZACK, R. (1999). Pain: an overview. *Lancet*, 353, 1607-1609.

MCGARAUGHTY, S., CHU, K.L., NAMOVIC, M.T., DONNELLY-ROBERTS, D.L., HARRIS, R.R., ZHANG, X.F., SHIEH, C.C., WISMER, C.T., ZHU, C.Z., GAUVIN, D.M., FABIYI, A.C., HONORE, P., GREGG, R.J., KORT, M.E., NELSON, D.W., CARROLL, W.A., MARSH, K., FALTYNEK, C.R., JARVIS, M.F (2007). P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146, 1817–1828.

MARTIN, H.A., BASBAUM, A.I., KWIAT, G.C., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. (1987). Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C and A-

delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience* 22, 651-9.

MARTINON F, TSCHOPP J (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*; 117:561–574.

MARTINON F, P'ETRELLI V, MAYOR A, TARDIVEL A, TSCHOPP J (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*; 440:237–241.

MARTINON, F; TSCHOPP, J (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 1, 10-22.

MARIATHASAN, S., NEWTON, K., MONACK, D. M., VUCIC, D., FRENCH, D. M., LEE, W. P., ROOSE-GIRMA, M., ERICKSON, S., AND DIXIT, V. M (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 430, 213–218.

MARIATHASAN S et al., (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*; 440(7081):228–32.

MARCUS R, WATT J (1980). Potential hazards of carrageenan [Letter]. *Lancet* 1:602–603

MARCUS R, WATT J (1981). Danger of carrageenan in foods and [Letter]. *Lancet* 1:338

MARCUS R (1981). Harmful effects of carrageenan fed to animals. *Cancer Detect Prev* 4:129–134

MIAO, E. A., ALPUCHE-ARANDA, C. M., DORS, M., CLARK, A. E., BADER, M. W., MILLER, S. I., AND ADEREM, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* 7, 569–575.

MIAO, E.A., ERNST, R.K., DORS, M., MAO, D.P., AND ADEREM, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2562–2567

MITRA, S., ABRAHAM, E. (2006). Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 732–741.

MOSER R, SCHLEIFFENBAUM B, GROSCURTH P, FEHR J (1989). Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J clin Invest*; 83:444-445

NAKAMURA M, FERREIRA SH (1987). A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*; 135: 145-53.

NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DMAREST, R.J. (1996). The human nervous system: structure and function. Pain and temperature, 5a ed., Williams & Wilkins, New York, pp. 123-137.

NORTH, R.A., (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.

OKA T, AOU S, HORI T (1993). Intracerebroventricular injection of interleukin-1b induces hyperalgesia in rat. *Brain Res* 624:61–68.

PALMER, G., GABAY, C., IMHOF, B. A. (2006). Leukocyte migration to rheumatoid joints: enzymes take over. *Arthritis Rheum.* 54, 2707–2710.

PARADA, C.A., YEH, J.J., JOSEPH, E.K., LEVINE, J.D. (2003). Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci* 17, 1847-52.

PELEGRIN P, SURPRENANT A. (2007). Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem*; 282: 2386–2394.

PETRILLI V et al., (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.*;14(9):1583–9.

PINTO LG, CUNHA TM, VIEIRA SM, LEMOS HP, VERRI WA, CUNHA FQ, et al., (2010). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*, 148:247-256.

POYET, J.L., SRINIVASULA, S.M., TNANI, M., RAZMARA, M., FERNANDES-ALNEMRI, T., AND ALNEMRI, E.S. (2001). Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 276, 28309–28313.

PHILLIP J. CATANZARO, MD, HOWARD J. SCHWARTZ, MD AND RICHARD C. GRAHAM, JR, MD. (1971). *Amer J Path* 64:387-404.

PRITHVI RAJ, P. (1996). *Pain Medicine (A Comprehensive Review)*. Mosby Year Book Inc.

RITTNER, H. L., MOUSA, S. A., LABUZ, D., BESCHMANN, K., SCHAFER, M., STEIN, C., BRACK, A. (2006). Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1022–1032.

RIES LAG, KOSARY CL, HANKEY BF, MILLER BA, CLEGG L, EDWARDS BK. (1999). *SEER Cancer Statistics Review 1973–1996*. Bethesda, MD:National Cancer Institute.

SAFIEH-GARABEDIAN, B., POOLE, S., HADDAD, J.J., MASSAAD, C.A., JABBUR, S.J., SAADE, N.E. (2002). The role of the sympathetic efferents in endotoxininduced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* 42, 864-72.

SARANGI PP, WARD AJ, SMITH EJ, STADDON GE, ATKINS RM. (1993). Algodystrophy and osteoporosis after tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br*; 75 : 450–2.

SILVEIRA, T. N., AND ZAMBONI, D. S (2010). Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect. Immun.* 78, 1403–1413.

SOMOGYI LP, MILLER S, KISHI A. (2005). Food additives. San Francisco (Calif): Specialty Chemicals, SRI Consulting.

SUN L, DENG L, EA CK, XIA ZP, CHEN ZJ (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell.*; 14:289–301.

SUTTERWALA, F. S., L. A. MIJARES, L. LI, Y. OGURA, B. I. KAZMIERCZAK, AND R. A. FLAVELL (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* 204: 3235–3245.

SUTTERWALA, F. S., AND FLAVELL, R. A (2009). NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin. Immunol.* 130, 2–6.

SUZUKI, T., L. FRANCHI, C. TOMA, H. ASHIDA, M. OGAWA, Y. YOSHIKAWA, H. MIMURO, N. INOHARA, C. SASAKAWA, AND G. NUNEZ. (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 3: e111.

SCHRODER K, TSCHOPP J (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140:821-32.

SCHWEIZER, A., FEIGE, U., FONTANA, A., MULLER, K. & DINARELLO, C. A. (1988). Agents Actions 25, 246–251.

SCHATZKIN A (2000). Available: [http://rex.nci.nih.gov/ NCI_Pub_ Interface/raterisk/risks129.html](http://rex.nci.nih.gov/NCI_Pub_Interface/raterisk/risks129.html) [cited 6 October].

SCHOTTENFELD D, WINAWER SJ. (1996). Cancers of the large intestine. In: Cancer Epidemiology and Prevention (Schottenfeld D, Fraumeni J, eds). 2nd ed. New York:Oxford University Press; 813–840.

TEIXEIRA, J.T., OKADA, M.O. (2003). Dor – evolução histórica dos conhecimentos. DOR Contexto interdisciplinar, Maio editora, Curitiba, pp.15-51.

TOBACMAN JK, WALLACE R, ZIMMERMAN B. (2001). Consumption of carrageenan and other water-soluble polymers used as food additives and incidence of mammary carcinoma in the United States in the twentieth century. Med Hypotheses; 56: 589–98.

TOBACMAN JK. (2001). Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. Environ Health Perspect; 109:983 – 94.

TSUJI, R.F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N.M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. (2003). Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. Clin. Exp. Allergy, 33, 249–258.

THORNBERRY, N. A., BULL, H. G., CALAYCAY, J. R., CHAPMAN, K. T., HOWARD, A. D., KOSTURA, M. J., MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER, J. R., AUNINS, J., ET AL. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 372, 768-74.

USOV AI, VELDE F VAN DE, KNUTSEN SH, ROLLEM HS, CEREZO AS (2002). ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci* 13:73–92

VERRI, W.A., JR., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112, 116-38.

WATKINS LR, WIERTELAK EP, GOEHLER LE, SMITH KP, MARTIN D, MAIER SF (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res.*, 654, 15-26.

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

WEDMORE, C. V., WILLIAMS, T. J. (1981). Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289, 646–650.

WILLIS TG, JADAYEL DM, DU MQ, PENG H, PERRY AR, ABDUL-RAUF M, PRICE H, KARRAN L, MAJEKODUNMI O, WLODARSKA I, PAN L, CROOK T, HAMOUDI R, ISAACSON PG, DYER JF (1999). BCL10 is involved in t (1;14)

(p22;q32) of MALT B Cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*; 96:46–56.

WHITFIELD, N. N., BYRNE, B. G., AND SWANSON, M. S (2010). Mouse macrophages are permissive to motile *Legionella* species that fail to trigger pyroptosis. *Infect. Immun.* 78, 423–432.

WU CJ, ASHWELL JD (2008). NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor mediated NF-κB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105:3023–3028.

YAMIN, T. T., AYALA, J. M., MILLER, D. K (1996). Activation of the native 45-KDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem* 22, 13273-82.

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*., 332, 411-5.

ZAMBONI, D. S., KOBAYASHI, K. S., KOHLSDORF, T., OGURA, Y., LONG, E. M., VANCE, R. E., KUIDA, K., MARIATHASAN, S., DIXIT, V. M., FLAVELL, R. A., DIETRICH, W. F., AND ROY, C. R. (2006). The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat. Immunol.* 7, 318–325.

ZIMMERMANN, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-10.

ZHANG Q, SIEBERT R, YAN M, HINZMANN B, CUI X, XUE L, RAKESTRAW KM, NAEVE CW, BECKMANN G, WEISENBURGER DD, SANGER WG, NOWOTNY H, VESELY M, CALLET-BAUCHU E, SALLES G, DIXIT VM, ROSENTHAL A, SCHLEGELBERGER B, MORRIS SW (1999). Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t (1;14) (p22;q32). *Nat Genet.*; 22:63–68.

ZHOU H, WERTZ I, O'ROURKE K, ULTSCH M, SESHAGIRI S, EBY M, XIAO W, DIXIT VM (2004). Bcl10 activates the NF- κ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature.*; 427:167–171.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 149/2011, sobre o projeto intitulado "*Investigação da participação do inflamassoma na gênese da dor inflamatória*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Thiago Mattar Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de outubro de 2011.

(We certify that the protocol nº 149/2011, about "*Investigation of the of inflammatory in the genesis of inflammatory pain*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 10/31/2011.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal