CAMILA SQUARZONI DALE

Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N

> São Paulo 2006

CAMILA SQUARZONI DALE

Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N

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

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada Orientador: Dra. Renata Giorgi

São Paulo 2006 Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Hilm col 1106

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1776
Dale, Camila Squarzoni Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao Cterminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N / Camila Squarzoni Dale. – São Paulo: C. S. Dale, 2006. 179 f. : il.
Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.
Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.
Orientador: Dra Renata Giorgi.
1. S100A9. 2 PAR₂. 3. Antinocicepção. 4. Neurônios sensoriais. 5. Hiperalgesia 1 Título

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DALE, Camila Squarzoni

Título: Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N

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

| Data:/ | / | |
|--------|---|--|
|--------|---|--|

Banca Examinadora

| Prof. Dr.: | Instituição: | |
|-------------|--------------|--|
| Assinatura: | Julgamento: | |
| | T | |
| Prof. Dr | Instituiçao: | |
| Assinatura: | Julgamento: | |
| | | |
| Prof. Dr | Instituição: | |
| Assinatura: | Julgamento: | |
| Prof. Dr | Instituição: | |
| Assinatura: | Julgamento: | |
| Prof. Dr | Instituição: | |
| Assinatura: | Julgamento: | |



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) Av. Dr. Vital Brazil, 1500 CEP 05503-900 Tel. 011-37267222 r.2239 Fax 011-37261505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 122/2003, referente ao projeto "Avaliação da atividade antinociceptiva de peptídeos análogos à porção C-terminal da proteína ligante de cálcio MRP-14 murina. Possível efeito sobre os receptores ativados por proteases (PAR's)", de responsabilidade da Dra. Renata Giorgi está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

São Paulo, 12 de maio de 2003.

Wilson Fernandes

Presidente da CEUAIB

A Deus

Obrigada pelo amor em minha vida. Obrigada pelo amor que me rodeia, a cada dia da minha vida. Obrigada pelo amor que Eu Sou.

Obrigada pelo meu corpo perfeito.

Obrigada pela minha saúde e vitalidade.

Obrigada pelo milagre da vida que eu sou.

Obrigada pelo presente da vida que eu vejo refletida ao meu redor.

Obrigada pelas maravilhosas possibilidades e probabilidades.

Obrigada pela beleza e harmonia.

Obrigada pela alegria.

Obrigada pelo riso e pela brincadeira.

Obrigada pela aventura de minha vida e

obrigada por eu poder me maravilhar.

Obrigada pela paz e tranqüilidade.

Obrigada pela Paz que Eu Sou.

Obrigada.

Aos meus pais Antonio Luis (*em memória*) e Mirta Simplesmente por serem meus pais. As criaturas mais lindas que já conheci na minha vida!

Obrigada

Por terem me entendido enquanto eu crescia e por terem aceitado minhas tão rápidas mudanças. Deve ter sido difícil manter-se em calma comigo, mas vocês sempre tentaram e quase sempre conseguiram...

Por terem me ouvido e terem me dado claras e breves respostas às dúvidas e perguntas que eu levava a vocês. Por terem reforçado minha confiança para continuar revelando meus pensamentos e sentimentos.

Por terem me aplaudido quando fui verdadeiro, por terem me compreendido quando eu disse mentiras, por terem me provado que elas maculam nosso caráter.

Por terem me falado sobre os seus erros e sobre as coisas que vocês aprenderam com eles. Isso fez com que eu aceitasse meus próprios erros, que também aprendesse e que me perdoasse.

Por prestarem-me atenção e gastarem tão grande parte do seu tempo comigo. Isso me levou a acreditar que sou importante e que tenho muito valor.

Por agirem sempre do modo que desejassem que eu agisse. Foi assim que vocês me deram um modelo positivo para seguir.

Por confiar em mim e me respeitar mesmo quando eu era menor do que vocês. Por terem considerado meus sentimentos e necessidades, e terem me mostrado muitas vezes que elas eram semelhantes às suas.

Pelos elogios e pelos incentivos. Foi sempre por isso que eu me senti boa e quis continuar sendo digna da sua fé em mim.

Por ajudarem-me a explorar meus talentos e potenciais. Por terem me ensinado que para ser feliz eu tinha que ser eu mesmo.

Por serem vocês mesmos. Com isso eu aprendi a buscar uma vida feliz.

Obrigada.

Ao meu irmão Renato

Por ser meu irmão, meu "bro" o cara mais engraçado que já vi.

Você é meu irmão por natureza, por qualquer coisa do destino, mas se eu pudesse ter

escolhido, não podia ter sido melhor ou diferente.

Renato, porque eu quis.

Irmão porque eu te amo!!

Agradecer você.....

Você, que esteve ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas e que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria...

Agradecer pelo sorriso diário (ou quase diário....) sem mágoas nem rancores, agradecer de peito aberto, de alma explosiva...

Hoje quero parar e agradecer, porque você fez, faz e fará sempre parte de minha história!

Te amo!

Ao Mike Por me mostrar que felicidade significa manter o coração aberto para aquilo que acontece ao seu redor.

Amo você!

It's a little bit funny this feeling inside I'm not one of those who can easily hide I don't have much money but boy if I did I'd buy a big house where we both could live

If I was a sculptor, but then again, no Or a man who makes potions in a traveling show I know it's not much but it's the best I can do My gift is my song and this one's for you

And you can tell everybody this is your song It may be quite simple but now that it's done I hope you don't mind I hope you don't mind that I put down in words How wonderful life is while you're in the world

I sat on the roof and kicked off the moss Well a few of the verses well they've got me quite cross But the sun's been quite kind while I wrote this song It's for people like you that keep it turned on

So excuse me forgetting but these things I do You see I've forgotten if they're green or they're blue Anyway the thing is what I really mean Yours are the sweetest eyes I've ever seen (Elton John)

À Renata

Pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade, interlocutor interessado em participar de minhas inquietações, co-autor em vários trechos. Agradeço, principalmente, pela confiança, mais uma vez depositada, no meu trabalho, pelo prazer de sua orientação e por toda confiança e dedicação.

O dia mais importante da vida da gente não é o dia em que conhecemos uma pessoa, mas sim quando esta pessoa passa a existir dentro da gente!

Aos animais que cederam suas vidas sem opção de escolha e sem os quais a realização deste trabalho seria impossível.

Meus sinceros agradecimentos.

"Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e, neste dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade".

Leonardo da Vinci

Ando devagar porque já tíve pressa e levo esse sorríso, porque já choreí demaís.

Hoje me sínto maís forte, mais felíz quem sabe eu só levo a certeza de que muíto pouco eu sei, eu nada sei.

Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs, é

preciso o amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é

precíso a chuva para florír.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha,

e ir tocando em frente.

Todo mundo ama um día todo mundo chora, um día a gente

chega, no outro vaí embora.

Cada um de nós compõe a sua história, e cada ser em si, carrega o

dom de ser capaz, e ser felíz.

(Almír Sater)

Agradecimentos

Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigo. Há muitos tipos de amigos. Os primeiros, são o amigo pai e a amiga mãe. Mostram o que é ter vida.

Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos o nosso espaço para que ele floresça como nós. Passamos a conhecer toda a família, a qual respeitamos e desejamos o bem. O destino ainda nos apresenta outros amigos, os quais não sabíamos que iam cruzar o nosso caminho. Muitos desses são designados amigos do peito, do coração. São sinceros, são verdadeiros. Sabem o que nos faz feliz...

Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora.

Esses costumam colocar muitos sorrisos na face, durante o tempo que estamos por perto.

Falando em perto, não podemos nos esquecer dos amigos distantes, que quando o vento sopra, aparecem novamente nas nossas vidas.

O tempo passa e perdemos alguns de nossos amigos. Algumas nascem num outro verão e outros permanecem por muitas estações. O que nos deixa mais felizes é quando os amigos mesmo distantes continuam por perto, continuam alimentando a nossa alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzavam o nosso caminho. Desejo a você, meu

amigo, paz, amor, saúde, sucesso, prosperidade... Hoje e sempre...

Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.

Obrigada pela oportunidade de te conhecer.....

À FAPESP, CAPES e ao Canadian Insitute of Health and Research pelo apoio financeiro.

Á Dra. Ida S. Sano-Martins por permitir a realização desse trabalho no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan;

Aos pesquisadores e estagiários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan pela convivência maravilhosa e por toda amizade que tornam nosso Laboratório um local excepcional;

Ao pessoal de apoio do Laboratório de Fisiopatologia: Nicolau, Neusa, Angela, Silvana, Iracema, Neuceli, Dna. Alice, Terezinha e Juscelino por todo carinho e pela ajuda indispensável para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Luiz Juliano Neto e a Dra. Maria Aparecida Juliano, do Departamento de Biofísica do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal Paulista, pela síntese dos peptídeos;

Ao Dr. Luiz Roberto Britto por abrir as portas do seu Laboratório para que eu pudesse realizar os ensaios de imuno-histoquímica, mas principalmente ao "Britto" por todo carinho, dedicação e boa vontade, por todos os jogos de futebol e porradinhas....

Ao Didis, querido, obrigada por tudo!!!

A Divi, pelos almoços inesquecíveis, sérios ou engraçados, sempre foram importantes para mim! Pela sua amizade sincera e carinho!

A Sandrinha Tomy pelas palavras de carinho sempre na hora certa....

À Yara Cury por todo seu carinho e por sempre transmitir seus conhecimentos e conselhos;

Ao Marcelo por todo carinho, amizade, PACIÊNCIA, que fazem de você uma pessoa única e que poucos tem a sorte de ter ao lado!

A Dra. Nathalie Vergnolle pela possibilidade de realizar parte de meus estudos em seu Laboratório na Universidade de Calgary, mas principalmente à Nathalie por todo carinho e amizade.

Ao Kevin, Lory, Marinella, Eric, Cathy, Simon, Steeve por terem feito o tempo passar mais depressa enquanto estive em Calgary. Obrigada por toda ajuda, carinho e amizade.

Às meninas da pós-graduação Cláudia, Deise e Joana por toda a paciência!

À Silvia....querida, muito obrigada por tudo, MESMO, pelos "galhos", pela ajuda, mas principalmente pelas palavras amigas e de carinho!!!!

À Ro, sem comentários, minha amiga querida e grande responsável pela minha entrada na carreira científica. Sem você eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo "todo dia". Vou sentir muito sua falta!

À Ingão, querida, minha amiga de tantas jornadas.....com quem eu aprendi a ser corajosa e a virar gente grande.....Obrigada!

À Cris, amiga querida, obrigada pela convivência maravilhosa, pelos conselhos, mas principalmente pelas ótimas risadas!!!

Ao Flavor por fazer os dias mais coloridos, engraçados e felizes!

À Samy, minha amiga de sala, todo dia, obrigada por estar sempre ali do lado quando eu precisei!

À Giba, mamãe agora....por termos dividido momentos tão bacanas.

À Bibis, cabeção, maluquinha do bem. Muito bom ter você por perto.

Ao Junola, aquele que não sabe falar não! Obrigada por estar sempre por perto!

À Tchau-tchau, menina, que não sabe quem é o ABBA, mas que eu adoro assim mesmo!

À Gutcha, minha amiga chique, mãe do Butantan....vou sentir falta do puro de Marley!!

À Chabu, aquela que resolve tudo "facinho" e que bota pilha na galera como ninguém!!! Nunca vou esquecer o Dom Juan!!!

Paty, obrigada pelo carinho e amizade. Jamais deixe que esse mundo fique mal freqüentado!!!

À Ferdis, amiga do almoço de todos os dias....coração grande, nunca perca isso!

À Lilits que esta longe mais dentro do coração sempre!!

À Carlota, a amiga dançarina...seja sempre feliz!

Ao Necão, que mora no meu coração!!

À Carina, a caquinha, obrigada pelo carinho e amizade.

À Re, que chegou por último, de mansinho e conquistou todo mundo com seu jeitinho doce! Você vai longe!!!!

Ao Thi. Menino grande. Boa sorte na sua nova jornada!!!!

Vocês que fizeram parte do meu dia a dia, todo dia nos últimos 8 anos....com vocês aprendi o que quer dizer carinho, amizade, gostar por gostar.....queria deixar uma mensagem mais profunda pra cada um de vocês....ai eu pensei, pensei e vi que não sei nem como começar a dizer o que cada um significa pra mim. Então deixo essa historinha que acho que pra cada um de nós fala por si. Amo vocês!! Sempre e pra sempre

Meu domingo alegre vai ser. De mãos dadas vou sair com você. Eh! Eh! Eh! Que dia feliz! De mãos dadas iremos passear. Eu, você, alegre a cantar. Eh! Eh! Eh! Que dia feliz! Ah! Ah! Ah! Hoje é meu dia! Eu vou ser o seu amor! Para ser feliz ao seu lado. Ah! Ah! Ah! Que dia feliz!!!!!

Aos "seis Silveiras", os que são gente e os que são bicho, sem exceção. Amo vocês, todo dia!! Minha tia-mãe, meu tio-pai e minha prima-irmã! Obrigada por fazerem e serem parte da minha vida!

A Sá, por fazer o meu irmão tão feliz!

A Niki, que eu amo e pronto!

E a Mel que é a coisa suja mais querida da minha vida!

A todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido

- no Laboratório de
- Fisiopatologia do Instituto

Butantan

DALE, C.S. Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao Cterminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais, via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N [Characterization of the antinociceptive effect of peptides homologous to the C-terminus of murine S100A9 protein. Effects on sensory neurons, *via* type-N voltage-dependent calcium channels] São Paulo, 2006. 179f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Resumo

O peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9mH⁹²-G¹¹⁰) inibe a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina. Em adição, este peptídeo inibe a hiperalgesia inflamatória induzida por tripsina, uma serino protease capaz de ativar receptores ativados por protease do tipo 2 (PAR₂). O objetivo inicial deste trabalho foi caracterizar a relação estrutura/ efeito do pS100A9m, a fim de determinar a menor seqüência peptídica dotada de atividade antinociceptiva. Ainda, como parte dos objetivos, neste trabalho foram investigados os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do pS100A9m e da menor sequência ativa sobre a hiperalgesia induzida pela ativação de PAR₂. Diferentes seqüências peptídicas homólogas ao pS100A9m foram sintetizadas e avaliadas em ratos submetidos ao modelo de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina. Dentre todas as següências peptídicas investigadas, o peptídeo denominado AcE⁹⁷-G¹⁰² foi determinado como a menor seqüência ativa com efeito semelhante ao pS100A9m. Com relação aos estudos sobre a ativação de PAR2, os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m bem como o AcE⁹⁷-G¹⁰² inibem a hiperalgesia térmica e mecânica decorrentes da ativação de PAR2 (induzida por um peptídeo agonista deste receptor -PAR₂AP). A análise por imuno-histoquímica demonstrou que a ativação de PAR₂ aumenta a expressão da proteína Egr-1 em neurônios nociceptivos, sendo o pS100A9m capaz de inibir este efeito. Em adição, ambos pS100A9m e AcE⁹⁷-G¹⁰² inibiram o influxo de cálcio induzido por PAR₂AP ou tripsina, em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG). Por outro lado, nenhum dos peptídeos apresentou efeito sobre a mobilização de cálcio em células HEK-293, que naturalmente expressam PAR₂, ou em células KNRK transfectadas com este tipo de receptor, sugerindo que o efeito tanto do pS100A9m quanto do AcE97-G102, sobre a ativação de PAR₂, seja específico para neurônios sensoriais. O pS100A9m e o AcE⁹⁷-G¹⁰² inibiram o influxo de cálcio nos neurônios DRG estimulados com bradicinina, capsaicina ou KCl.

Ainda, o pS100A9m inibiu a liberação de substância P induzida por PAR₂. Os resultados obtidos com o tratamento de neurônios DRG com tapsigaragina ou com ionóforo de cálcio sugerem um efeito direto do pS100A9m sobre os canais de cálcio. Desta forma, foi avaliada atividade do pS100A9m e do AcE^{97} - G^{102} sobre culturas de células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio dependente de voltagem do tipo N ou do tipo L. Os resultados obtidos demonstraram que ambos peptídeos inibirem o influxo de cálcio em células transfectadas com receptores do tipo N. Em conjunto, os dados aqui obtidos demonstram que o efeito do C-terminal da proteína S100A9 murina sobre a nocicepção experimental é devido a uma inibição de canais de cálcio do tipo N, por uma ação direta em neurônios sensoriais. Ainda, a seqüência responsável por este efeito está localizada na porção E^{97} - G^{102} do domínio C-terminal da proteína S100A9 murina.

Palavras-chave: S100A9, PAR₂, nocicepção, antinocicepção, neurônios sensoriais, canais de cálcio dependentes de voltagem.

DALE, C.S. Characterization of the antinociceptive effect of peptides homologous to the Cterminus of murine S100A9 protein. Effects on sensory neurons, *via* type-N voltagedependent calcium channels [Caracterização da atividade antinociceptiva de peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9 murina. Ação sobre neurônios sensoriais via canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N]. São Paulo, 2006. 179f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Summary

Peptide identical to the C-terminus of S100A9 protein (mS100A9pH⁹²-G¹¹⁰) inhibits inflammatory hyperalgesia induced by carrageenan and trypsin, a serine protease that activates protease-activated receptors 2 (PAR₂). The aim of this work was to characterize the relationship between structure and function of mS100A9p in order to identify the shortest peptide sequence endowed with antinociceptive effect. Furthermore, the mechanisms involved on the antinociceptive effect of both mS100A9p and the shortest homologous sequence on PAR₂induced hyperalgesia were also evaluated. Different peptide sequences homologous to mS100A9p were synthesized and evaluated in rats submitted to the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia model. Among all evaluated sequences, the peptide AcE^{97} -G¹⁰² was found to be the shortest sequence that showed an antinociceptive effect similar to that induced by mS100A9p. In regard to PAR₂ activation, data obtained herein demonstrated that both mS100A9p and AcE⁹⁷-G¹⁰² inhibit PAR₂-induced mechanical and thermal hyperalgesia, induced by the selective agonist peptide - PAR₂AP. Imunohistochemical evaluation demonstrated that PAR₂ activation increased Egr-1 protein expression on sensory neurons and mS100A9p inhibited this effect. In addition, both mS100A9p and AcE⁹⁷-G¹⁰² inhibited PAR₂- and trypsin-induced calcium influx in dorsal root ganglia neurons (DRG). On the other hand, no effect on the calcium influx of the peptides were observed on HEK-293 cells or KNRK-PAR₂ transfected cells, suggesting that the effects of mS100A9p and AcE⁹⁷-G¹⁰² on PAR₂ activation are specific for sensory neurons. Both mS100A9p and AcE⁹⁷-G¹⁰² inhibited DRG calcium flux when cells were stimulated with bradykinin, capsaicin or KCl. Also, mS100A9p inhibited PAR2-induced substance P release in DRG. Treatment of DRG with either thapsigargin or calcium ionophore suggest a direct effect of

mS100A9p on calcium channels. To evaluate this hypothesis the effects of mS100A9p and AcE⁹⁷- G^{102} were evaluated on N-type or L-type voltage-dependent calcium channel transfected HEK-tsA cells. Both peptides inhibited calcium influx of N-type transfected cells. In conclusion, data presented herein demonstrate that the C-terminus of murine S100A9 protein inhibits experimental nociception through a block of N-type voltage-dependent calcium channels, directly on sensory neurons. Also, the domain involved in this effect is localized on the sequence E^{97} - G^{102} of the C-terminus of murine S100A9 protein.

Key words: S100A9, PAR₂, nociception, antinociception, sensory neurons, voltage dependent calcium channels.

Lista de Abreviaturas

| AP | Peptídeo agonista |
|---------------------|--|
| ARAC | Cytosina β – D – arabino – furanoside - hidrochlorido |
| BaCl ₂ | Cloreto de bário |
| CaCl | Cloreto de cálcio |
| CsCl | Cloreto de césio |
| Cg | Carragenina |
| CGRP | Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina |
| CsMeSO ₄ | Sulfato de césio monometil |
| egr-1 | Gene que codifica para a proteína Egr-1 |
| Egr-1 | Proteína de resposta inicial 1 (Early growth response protein 1) |
| EGTA | Ácido acético (ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N'N'-tetraacetic acid) |
| ELISA | Ensaio imuno-enzimático de ligação de anticorpo |
| e.p.m. | Erro padrão da média |
| DMEM | Meio Eagle Dubelco`s modificado (Modified Eagle Medium) |
| DRG | Gânglio da raiz dorsal (dorsal root ganglia) |
| fMLP | N-formil-metionil-leucil-fenilalanina |
| FMOC | N-alfa-(9-fluorenilmethiloxicarbonil) |
| FUDR | 5 – fluoro – 2 – desoxi - uridina |
| GTP | Solução salina de Guanosina 5'-trifosfato de sódio |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| i.pl. | Intraplantar |

| HBSS | Solução salina balanceada de Hank (Hank's balanced salt solution) |
|----------------------------------|---|
| HEK-293 | Human embryonic kidney cells |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta performance |
| HVA | Ativado por alta voltagem (high voltage activated) |
| H ₂ O | água |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrogênio |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KNRK | Kirsten virus-transformed kidney cells |
| KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potássio monobásico |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LTB-4 | Leucotrieno B 4 |
| LVA | Ativado por baixa voltagem (low voltage activated) |
| MALDI | Dessorção de íons induzida por laser |
| MIF | Fator Inibidor de Migração |
| MEM | Meio mínimo essencial |
| MRP | MIF Related Protein (proteína relacionada com o MIF) |
| MgATP | Adenosina Trifosfato de magnésio |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato dissódico |
| NaH ₂ PO ₄ | Dihidrogenofosfato de sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de sódio |
| Na ₂ PO ₄ | Sódio fosfato |

| NGF | Fator de crescimento de nervo |
|---------------------|---|
| NIF | Fator Imobilizador de Neutrófilos |
| NO | Óxido nítrico |
| PAR | Receptor ativado por protease |
| PAR ₂ | Receptor ativado por proteases do tipo 2 |
| PAR ₂ AP | Peptídeo agonista de PAR ₂ |
| РВ | Tampão fosfato |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| рН | Potencial de hidrogênio iônico |
| pS100A9m | Peptídeo sintético idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PGI2 | Prostaciclina |
| РКС | Proteína quinase C |
| РҮ | Piruvato de sódio |
| SP | Substância P |
| TEACI | Cloreto de tetraetilamonio |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TOF | Time of flight (tempo de vôo) |
| TRPV | Receptores vanilóides de potencial transitório |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| VDCC | Canais de cálcio dependentes de voltagem |

Lista de Símbolos

| δ | delta |
|-----|---------------|
| α | alfa |
| β | beta |
| % | porcentagem |
| ± | mais ou menos |
| °C | graus Celsius |
| μg | micro grama |
| μL | micro litro |
| μM | micro molar |
| h | hora |
| min | minuto |
| g | grama |
| Μ | molar |
| U | unidade |
| mМ | milimolar |
| nM | nanomolar |
| < | menor |
| S | segundo |
| + | mais |
| - | menos |
| = | igual |

Lista de figuras

| Figura 1. | Esquema representativo da via de transmissão nociceptiva | 36 |
|------------|---|----|
| Figura 2. | Esquema representativo da estrutura cristalográfica da calprotectina - | |
| | complexo heterodimérico formado pelas proteínas S100A8 e S100A9 | 44 |
| Figura 3. | Domínios estruturais e funcionais de PARs | 51 |
| Figura 4. | Efeito do H^{96} - G^{110} , P^{100} - G^{110} ou H^{107} - G^{110} sobre a hiperalgesia | |
| | induzida pela carragenina | 76 |
| Figura 5. | Efeito do H^{92} -S ¹⁰⁶ ou H^{92} -G ¹⁰² sobre a hiperalgesia induzida pela | |
| | carragenina | 77 |
| Figura 6. | Efeito do H^{92} - E^{97} ou E^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia induzida pela | |
| | carragenina | 78 |
| Figura 7. | Efeito do H^{96} - R^{101} , H^{96} - G^{102} ou E^{97} - P^{100} sobre a hiperalgesia induzida | |
| | pela carragenina | 79 |
| Figura 8. | Efeito do H^{96} - P^{100} ou E^{97} - R^{101} sobre a hiperalgesia induzida pela | |
| | carragenina | 80 |
| Figura 9. | Efeito do E^{97} - $R^{101}COO^{-}$ sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina. | 81 |
| Figura 10. | Efeito do AcH^{96} - P^{100} ou AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia induzida pela | |
| | carragenina | 82 |
| Figura 11. | Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo | |
| | PAR ₂ AP | 92 |
| Figura 12. | Efeito do pré-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica | |
| | induzida pelo PAR ₂ AP | 93 |
| Figura 13. | Efeito do pós-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica | |
| | induzida pelo PAR ₂ AP | 94 |
| Figura 14. | Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo | |
| | PAR ₂ AP | 95 |
| Figura 15. | Efeito do pré-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica | |
| | induzida pelo PAR ₂ AP | 96 |
| Figura 16. | Efeito do pós-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica | |
| | induzida pelo PAR ₂ AP | 97 |

| Figura 17. | Efeito da salina, pS100A9m, PAR ₂ AP, ou PAR ₂ AP concomitante ao | |
|--------------|---|-----|
| | pS100A9m na expressão de Egr-1 no corno dorsal da medula espinhal | |
| | de ratos | 98 |
| Figura 18. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| | estimulados com tripsina | 99 |
| Figura 19. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| | estimulados com .PAR ₂ AP | 100 |
| Figura 20 | Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células HEK- | |
| | 293 estimuladas com tripsina | 101 |
| Figura 21. | Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células HEK- | |
| | 293 estimuladas com PAR ₂ AP | 102 |
| Figura 22. | Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células KNRK- | |
| | PAR ₂ estimuladas com tripsina | 103 |
| Figura 23. | Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células KNRK- | |
| _ | PAR ₂ estimuladas com PAR ₂ AP | 104 |
| Figura 24. | Efeito do pS100A9m sobre a liberação de substância P (SP) em | |
| _ | culturas de neurônios DRG avaliadas por ELISA | 105 |
| Figura 25. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| C | estimulados com capsaicina ou bradicinina | 106 |
| Figura 26. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| 0 | estimulados com KCl | 107 |
| Figura 27. | Efeito da tapsigaragina no efeito do pS100A9m sobre o influxo de | |
| 8 | cálcio em neurônios DRG | 108 |
| Figura 28. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| 8 | estimulados com ionóforo de cálcio | 109 |
| Figura 29. | Efeito do pS100A9m sobre correntes nativas de cálcio em neurônios | |
| | DRG avaliados por eletrofisiología. | 110 |
| Figura 30. | Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA | 110 |
| i igui u coi | transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N | |
| | ou do tipo I | 111 |
| Figura 31 | Efeito do $nS100A9m$ sobre correntes de cálcio em cálulas HEK tsA | 111 |
| 1 igui a 51. | Lieno do portorizin sobre contentes de calcio em celulas HER-ISA- | |

| | 201 transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do | |
|------------|--|-----|
| | tipo N e avaliadas por eletrofisiologia | 112 |
| Figura 32. | Curva tempo/efeito do bloqueio de amplitude de corrente de cálcio via | |
| | canais do tipo N, pelo pS100A9m em células tsA-201 | 113 |
| Figura 34. | Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia mecânica induzida por | |
| | PAR ₂ AP | 118 |
| Figura 35. | Efeito do pré-tratamento com o AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre a hiperalgesia | |
| | mecânica induzida por PAR ₂ AP | 119 |
| Figura 36. | Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre a hiperalgesia térmica induzida por | |
| | PAR ₂ AP | 120 |
| Figura 37. | Efeito do pré-tratamento com o AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre a hiperalgesia | |
| | térmica induzida por PAR ₂ AP | 121 |
| Figura 38. | Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG | |
| | estimulados com tripsina ou PAR ₂ AP | 122 |
| Figura 39. | Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre a sinalização de cálcio em células HEK- | |
| | 293 | 123 |
| Figura 40. | Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre a sinalização de cálcio em células KNRK- | |
| | PAR ₂ | 124 |
| Figura 41. | Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre o influxo de cálcio em neurônios | |
| | DRG | 125 |
| Figura 42. | Efeito AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA | |
| | transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N | |
| | ou do tipo L | 126 |

Lista de Tabelas

| Tabela 1. Seqüências peptídicas correspondentes ao C-terminal da proteína S100A9 | |
|---|----|
| murina | 62 |
| Tabela 2. Seqüências peptídicas homólogas ao C-terminal da proteína S100A9 | |
| murina e respectivas concentrações efetivas no modelo de hiperalgesia | |
| induzida por carragenina | 83 |

SUMÁRIO

| 1. INTRODUÇÃO | 34 |
|---|----|
| 2. OBJETIVOS | 56 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 58 |
| 3.1. Planejamento Experimental | 59 |
| 3.2. Animais | 61 |
| 3.3. Síntese dos peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9 | 61 |
| 3.4. Indução de hiperalgesia inflamatória | 63 |
| 3.5. Avaliação da sensibilidade dolorosa | 63 |
| 3.6. Tratamento com os peptídeos sintéticos | 64 |
| 3.7. Marcação de ativação celular por imuno-histoquímica | 66 |
| 3.8. Avaliação de ativação celular pela mobilização de cálcio em células HEK-293 | 1 |
| ou células KNRK-PAR ₂ | 67 |
| 3.9. Secreção de Substância P | 68 |
| 3.10. Expressão de canais de cálcio recombinantes | 69 |
| 3.11. Avaliação de ativação celular pela da mobilização de cálcio em neurônios do | |
| gânglio da raiz dorsal da medula espinhal ou células HEK-tsA | 69 |
| 3.12. Eletrofisiologia | 70 |
| 3.13. Análise estatística | 71 |

| 4. RESULTADOS | 73 |
|---|----|
| 4.1. Avaliação da relação estrutura/efeito do C-terminal da proteína S100A9 sobre | |
| a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina | 74 |
| 4.2. Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo | |
| pS100A9m – Ação sobre PAR ₂ | 84 |
| 4.2.1. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR ₂ AP – <u>Tratamento concomitante por</u> | 84 |
| 4.2.2. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR ₂ AP – <u>Tratamento prévio</u> | 84 |
| 4.2.3. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR ₂ AP – Pós tratamento. | 85 |
| 4.2.4. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR ₂ AP – <u>Tratamento concomitante</u> | 85 |
| 4.2.5. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR ₂ AP – <u>Tratamento prévio</u> . | 85 |
| 4.2.6. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR ₂ AP – Pós tratamento. | 86 |
| 4.2.7. Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 induzida por PAR ₂ AP | 86 |
| 4.2.8. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais. | 86 |
| 4.2.9. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-293 e células KNRK-PAR ₂ | 87 |
| 4.2.10. Efeito do pS100A9m sobre a liberação de substância P induzida pela ativação de PAR ₂ em neurônios sensoriais | 88 |

| 4.2.11. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais, | |
|---|-----|
| induzido por bradicinina, capsaicina ou KCl | 88 |
| 4.2.12. Efeito da tapsigaragina ou do ionóforo de cálcio, sobre a inibição do influxo de cálcio induzida pelo pS100A9m, em neurônios DRG | 89 |
| 4.2.13. Efeito do pS100A9m sobre correntes de cálcio de alta voltagem, em neurônios | |
| DRG avaliados por eletrofisiologia | 89 |
| 4.2.14. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA 201 | |
| transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem | 90 |
| 4.2.15. Efeito do pS100A9m sobre correntes de cálcio de alta voltagem, em células | |
| HEK-tsA 201 transfectadas com VDCC. | 90 |
| 4.3. Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo | |
| AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² – Ação sobre PAR ₂ | 115 |
| 4.3.1. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia mecânica induzida por <u>PAR₂AP</u> | 115 |
| 4.3.2. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia térmica induzida por <u>PAR₂AP</u> | 115 |
| 4.3.3. Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais. | 116 |
| 4.3.4. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em células HEK-293 e células | |
| <u>KNRK-PAR₂</u> | 116 |
| 4.3.5. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais induzido | |
| por bradicinina, capsaicina ou KCl | 116 |
| 4.3.6. Efeito do AcE ⁹⁷ -G ¹⁰² sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA 201 | |
| transfectadas com VDCC | 117 |
| 5. DISCUSSÃO | 127 |

| 6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS | 142 |
|---|-----|
| 7. CONCLUSÃO | 144 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 146 |
| Apêndíce | 161 |
| Trabalho publicado: The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia | |
| induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR2) | |
| Anexoz | 173 |
| Soluções utilizadas | |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

A dor é definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada ou não à lesão tecidual (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001). É um sinal característico dos mecanismos normais de proteção do organismo contra o dano tecidual (DRAY, 1997). Uma das funções vitais do sistema nervoso é prover informações sobre a ocorrência ou perigo de injúria. A sensação de dor, pela sua natureza inerente, contribui para essa função. A dor não é homogênea e compreende três categorias: fisiológica, inflamatória e neuropática. É uma função relacionada a estruturas do Sistema Nervoso formada de componentes discriminativo, afetivomotivacional, cognitivo e locomotor (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001).

Em condições fisiológicas, a dor é iniciada pela geração de potenciais de ação em fibras aferentes primárias, de pequeno diâmetro, dos nervos periféricos, do tipo C e Að. Estas fibras possuem receptores para a dor, denominados de nociceptores, os quais apresentam terminações sensoriais nos tecidos periféricos e que são ativados por estímulos de vários tipos, sendo diferenciados de outros receptores sensoriais, como os mecânicos e térmicos, por seu limiar mais alto, os quais são normalmente ativados apenas por estímulos de intensidade nociva (RANG et al., 1997). Uma vez ativados, os nociceptores ativam sinapticamente neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios primários sensoriais contêm vários neuropeptídeos, os quais são liberados e atuam como mediadores químicos nas terminações tanto centrais quanto periféricas destes neurônios, desempenhando papel importante na resposta nociceptiva dolorosa (Figura 1) (RANG et al., 1997). Dentre esses neuropeptídeos estão a substância P (SP) e o peptídeo relacionado com o gene da calciotonina (CGRP), que são liberados das terminações nervosas dos aferentes nociceptivos primários e atuam nos vasos sangüíneos e células inflamatórias exercendo efeitos pró-inflamatórios nos tecidos periféricos
(DRAY & BEVAN, 1993; RANG et al., 1997). Os neurônios sensoriais utilizam ainda aminoácidos excitatórios, como o glutamato e aspartato, para a transmissão do impulso doloroso ao Sistema Nervoso Central (SNC) (DRAY, 1997). Dos neurônios sensoriais periféricos, a informação nociceptiva segue tanto por neurônios do trato ascendente, quanto por interneurônios que fazem parte das vias de reflexos vegetativos. Os axônios ascendentes do trato espinotalâmico ativam o Sistema Tálamo-cortical, que irá produzir a consciência da sensação de dor (Figura 1) (revisto por SCHAIBLE & RICHTER, 2004).



Figura 1. Esquema representativo da via de transmissão nociceptiva. Adaptado de JESSELL & KELLY et al., 1991.

A transmissão de sinais dolorosos em nível espinhal envolve a participação de canais iônicos (ALTIER & ZAMPONI, 2006). Estes canais iônicos são expressos nos neurônios sensoriais e sua ativação gera a formação de correntes em direção ao interior ou ao exterior das células, que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular causando excitação ou inibição dos neurônios (revisto por LEE et al., 2005; revisto por WOOD, 2003). Para se despolarizar os terminais de membrana dos nervos, tanto as correntes em direção ao interior devem ser geradas, quanto as correntes em direção ao exterior devem ser inibidas. A ativação destes canais em neurônios sensoriais é evidentemente crítica para dar início aos sinais nociceptivos. Os principais canais responsáveis pela geração das correntes internas nos nociceptores são os canais de sódio e canais de cálcio dependentes de voltagem, enquanto que as correntes externas são principalmente geradas pelos íons potássio (revitso por LEE et al., 2005; revisto por WOOD, 2003). Ainda, a ativação de canais catiônicos não seletivos (como canais vanilódes de potencial transitório, canais purinérgicos e canais ionotrópicos para serotonina) também é responsável pela excitação dos neurônios sensoriais. Desse modo, a excitabilidade dos neurônios pode ser controlada pela regulação da expressão ou modulação da atividade destes canais (revitso por LEE et al., 2005).

A dor inflamatória é gerada pela estimulação inespecífica da inervação sensitiva dos tecidos e pela ação de mediadores químicos, os quais são liberados durante a interação de leucócitos e agentes a serem eliminados do tecido lesado (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001; revisto por SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Já a dor neuropática é causada por lesões periféricas ou centrais do Sistema Nervoso. Ambos os tipos de dor, inflamatória e neuropática, são caracterizadas pelo aumento na sensibilidade tanto no sítio da lesão quanto no tecido normal adjacente. Esta sensibilização acarreta os fenômenos de alodínia mecânica ou térmica, que surgem como sintomas a partir de estímulos que geralmente não causariam dor, ou de

hiperalgesia, traduzida por dor intensa e prolongada resultante de estimulação nociva (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001; revisto por SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

A inflamação, por si só, é um grande agente causador de dor. Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, particularmente as fibras C são ativadas em resposta à ação de mediadores químicos liberados por células lesadas, ou por substâncias sintetizadas durante os eventos que se seguem após a injúria tecidual (DRAY, 1997). A liberação de mediadores gerados durante o processo inflamatório induz um aumento da atividade dos nociceptores, o que se traduz em dor inflamatória (LEVINE & REICHLING, 1999). Esses mediadores podem agir direta ou indiretamente sobre os nociceptores, conjuntamente com a formação de edema local e lesão dos feixes nervosos periféricos sensitivos (DRAY & BEVAN, 1993). É importante ressaltar que além da estimulação de fibras sensoriais periféricas, muitas alterações fisiológicas importantes estão associadas com a indução de dor. São alterações na circulação local e permeabilidade vascular, ativação e migração de células imunes e mudanças na liberação de fatores tróficos e de crescimento dos tecidos adjacentes (revisto por DRAY, 1995).

Os mediadores químicos produzidos durante a inflamação podem ativar neurônios sensoriais nociceptivos de duas maneiras, quais sejam ativando diretamente os nociceptores causando dor, como no caso da bradicinina, histamina, leucotrienos, serotonina, íons hidrogênio e glutamato (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001; revisto por SCHAIBLE & RICHTER, 2004), ou sensibilizando-os gerando o fenômeno de hiperalgesia periférica, que resulta em um aumento na percepção em resposta à dor, gerada pela ação indireta dos mediadores químicos sobre os nociceptores, diminuindo o limiar de ativação desses receptores para um segundo estímulo (FERREIRA, 1990; DRAY e BEVAN, 1993; revisto por DRAY, 1995; DRAY, 1997; LEVINE e REICHLING, 1999). Diferentes mecanismos foram propostos para explicar o

fenômeno de hiperalgesia, tais como a sensibilização dos nociceptores pela produção de prostanóides ou pela liberação de diferentes mediadores durante a injúria do tecido, anóxia ou baixo pH (revisto por RIEDEL & NEECK, 2001; revisto por SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Dentre os mediadores que participam do fenômeno de hiperalgesia estão os leucotrienos, a serotonina, a histamina, a adenosina, o fator de crescimento neural (NGF), a noradrenalina e a bradicinina (DRAY, 1995; DRAY, 1997; FERREIRA, 1990; LEVINE & REICHLING, 1999). As substâncias que medeiam o fenômeno de dor durante o processo inflamatório são liberadas por leucócitos circulantes e plaquetas, células endoteliais, células residentes (incluindo mastócitos), neurônios sensitivos primários e fibras sensoriais simpáticas (revisto por BESSON, 1999; LEVINE & REICHLING, 1999).

A produção de bradicinina é uma das respostas iniciais do tecido à injúria e é crítica para iniciar a dor e exacerbação da sinalização sensorial produzindo hiperalgesia (DRAY, 1997). A liberação de bradicinina ocorre em grandes quantidades durante o processo inflamatório agudo, seguida da liberação de proteases de células imunes como mastócitos, basófilos e neutrófilos (DRAY, 1997). Ainda, a bradicinina promove diversos outros aspectos da inflamação, incluindo aumento de influxo sanguíneo, formação de edema e liberação de outros mediadores inflamatórios (LEVINE et al., 1993; DRAY, 1994, 1995). A ação da bradicinina sobre a hiperalgesia está associada com a produção secundária de outros mediadores como prostanóides, taquicininas e CGRP, citocinas, produtos derivados de mastócitos como a serotonina e a histamina e óxido nítrico (NO). Daí sua importância no desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório e nociceptivo (CALIXTO et al., 2000).

Além da bradicinina outros mediadores químicos estão envolvidos na indução de hiperalgesia inflamatória. As prostaglandinas, por exemplo, são importantes mediadores deste

fenômeno. A prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaciclina (PGI2) são capazes de ativar diretamente os nociceptores causando dor, mas usualmente sensibilizam os neurônios aferentes primários reduzindo seu limiar de ativação a um segundo estímulo (DRAY, 1994; 1995; 1997). A PGE2 ainda é capaz de estimular a liberação de SP de neurônios sensoriais e é um mediador importante da hiperalgesia induzida pela bradicinina (LEVINE e REICHLING, 1999). A histamina e serotonina também são potentes indutores de hiperalgesia, sendo produzidas após a desgranulação de mastócitos. A histamina acarreta hiperalgesia pela indução da liberação de neuropeptídeos e prostaglandinas. A serotonina sensibiliza fibras aferentes primárias aumentando a permeabilidade dessas células ao cálcio, causando hiperalgesia (DRAY, 1997; LEVINE e REICHLING, 1999).

A hiperalgesia inflamatória tem sido demonstrada experimentalmente, auxiliando na elucidação dos mecanismos e dos mediadores envolvidos no processo. Assim, no modelo de hiperalgesia mecânica, na vigência de inflamação induzida por carragenina ou lipopolissacarídeo (LPS), o processo é iniciado pela bradicinina que, pela ativação de receptores B2, estimula a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que por sua vez estimula a produção de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e IL-8 (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993). A partir daí duas vias distintas se seguem. A IL-1 β e IL-6 irão estimular a produção de prostaglandinas (FERREIA et al., 1988) e a IL-8, induz a produção de aminas simpatomiméticas das fibras simpáticas (CUNHA et al., 1991). Essa seqüência de ativação de mediadores também se repete para a hiperalgesia induzida pela bradicinina.

Leucócitos, particularmente neutrófilos, também possuem papel importante no processo de hiperalgesia inflamatória. Neutrófilos, por exemplo, são capazes de se acumular em sítios inflamatórios degradando o material antigênico ou debris celulares e, o acúmulo dessas células no sítio inflamatório, é associado à presença de hiperalgesia (LEVINE & REICHLING, 1999). Neutrófilos liberam uma variedade de citoconas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) capazes de induzir hiperalgesia. Particularmente a IL-1 β possui potente efeito pró-inflamatório e hiperalgésico, além de ser capaz de estimular a síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios como o NGF e induzir a expressão de receptores em neurônios sensoriais e células imunes (DRAY, 1997). Ainda, a IL-1 β é capaz de estimular a produção de prostaglandinas, sendo a hiperalgesia induzida por esta citocina dependente desse mediador (LEVINE et al., 1984). A IL-8 também participa da indução de hiperalgesia inflamatória, sendo essa hiperalgesia simpático-dependente e não mediada por prostaglandinas (CUNHA et al., 1991). Com relação à participação de leucócitos na geração de hiperalgesia, trabalhos têm demonstrado que a hiperalgesia induzida por leucotrieno B4 (LTB-4) é dependente de neutrófilos (LEVINE et al., 1984), sendo este processo mediado pela atração e ativação dessas células, com posterior liberação de produtos hiperalgésicos capazes de sensibilizar os neurônios aferentes primários (LEVINE et al., 1985).

Por outro lado, trabalhos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram que a presença de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos acarreta um efeito antinociceptivo, em modelo de dor inflamatória visceral, mediado pela liberação de uma proteína ligante de cálcio, pertencente à família das proteínas S100 (SCHAFER et al., 1995), denominada S100A9 (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2002; PAGANO et al., 2006).

No que diz respeito à participação de macrófagos na resposta nociceptiva, tem sido demonstrado que macrófagos residentes possuem um papel importante no desencadeamento desse fenômeno. Os macrófagos são as principais células secretoras de mediadores químicos capazes de sensibilizar os nociceptores, dentre eles as prostaglandinas, ou ainda liberam substâncias que participam da cascata de indução da hiperalgesia, como a IL-1 β e o TNF- α

(CUNHA et al., 1991; FERREIRA et al., 1993). Nesse sentido, foi demonstrado que o sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com LPS induz nocicepção em camundongos, mediada por IL-1 β , TNF- α e IL-8. Em adição, macrófagos podem participar do desencadeamento da dor neuropática por liberarem TNF- α , um mediador importante na gênese deste fenômeno (LEVINE & REICHLING, 1999). Ainda, foi demonstrado que macrófagos residentes e mastócitos desempenham importante papel na nocicepção, observada no modelo das contorções abdominais, uma vez que essas células liberam mediadores que desencadeiam a hiperalgesia inflamatória (RIBEIRO et al., 2000).

Em contrapartida ao efeito das citocinas na indução de hiperalgesia, tem sido demonstrado que algumas interleucinas também são liberadas para regular este processo. A IL-10, por exemplo, é capaz de desativar macrófagos ativados (BOGDAN et al., 1991), além de limitar a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e bradicinina pela inibição da produção de outras citocinas (POOLE et al., 1995). Foi demonstrado que a IL-10 e IL-13 inibem, de maneira concentração dependente, a hiperalgesia inflamatória induzida no dorso de camundongos, pela exposição aguda dos animais à radiação ultravioleta e que este efeito está relacionado com a redução dos níveis de IL-1 β , TNF- α e NGF (SAADE et al., 2000). A IL-13, liberada de linfócitos, também limita a hiperalgesia inflamatória no modelo de pressão de pata de ratos pela inibição de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e prostaglandinas (LORENZETTI et al., 2001). Em adição, a IL-4 liberada de mastócitos controla a hiperalgesia inflamatória pela inibição da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 na fase inicial do processo e as prostaglandinas na fase mais tardia (CUNHA et al., 1999).

Além da participação de citocinas no controle da dor inflamatória, é demonstrado que a proteína ligante de cálcio S100A9, a qual está presente em altas concentrações no citosol de

neutrófilos e monócitos (EDGEWORTH et al., 1991), também possui a capacidade de inibir a dor inflamatória, quando avaliada no modelo das contorções abdominais (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2002, PAGANO RL, 2001; PAGANO et al., 2006).

1.2. Proteína S100A9

A proteína S100A9, juntamente com outra proteína denominada S100A8 foram inicialmente isoladas, seqüenciadas e clonadas de culturas de células das quais se tentava caracterizar o MIF - Migration Inhibitory Factor (ODINK et al., 1987), daí sua denominação inicial de MRP-8 (para S100A8) e MRP-14 (para S100A9), onde MRP refere-se à "MIF Related Proteins" e 8 ou 14 aos seus pesos moleculares (ODINK et al., 1987; HESSIAN et al., 1993). Posteriormente essas proteínas foram denominadas de Myeloid Related Proteins (RAMMES et al., 1997), uma vez que são expressas por células da linhagem mielomonicítica. Estas proteínas também podem ser encontradas na literatura sob as denominações de p8 e p14 (HOGG et al., 1989), cadeia leve da L1 e cadeia pesada da L1 (ANDERSSON et al., 1988) e calgranulina A e calgranulina B (KELLY et al., 1989), respectivamente para S100A8 e S100A9.

As proteínas S100A8 e S100A9 pertencem à família das proteínas S-100 (ZIMMER et al., 1995; SCHÄFER et al., 1995), caracterizadas como um grupo de proteínas acídicas de baixo peso molecular (10-12 kDa), assim denominadas por serem 100% solúveis em sulfato de amônia (ZIMMER et al., 1995). Os genes que codificam para estas proteínas estão localizados na região 1q21 (SCHAFER et al., 1996). Estas proteínas são compostas por dois sítios ligantes de cálcio (KLIGMAN et al., 1988; HESSIAN et al., 1993) e ambas, S100A8 e S100A9, possuem ainda sítios de ligação para zinco localizados na porção His-X-X-His (revisto por STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004). Estas proteínas formam entre elas um complexo heterodimérico

denominado de calprotectina (Figura 2) (STEINBAKK et al., 1990; SOHNLE et al., 1991; revisto por STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004), sendo que a porção C-terminal da S100A9 é crítica para formação deste complexo (PROPPER et al., 1999).



Figura 2. Esquema representativo da estrutura cristalográfica da calprotectina – complexo heterodimérico formado pelas proteínas S100A8 e S100A9 (fonte: www.pubmed.com).

A função das proteínas da família S100 é tecido-específica, sendo relacionada com a regulação homeostásica de cálcio intracelular (revisto por STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004). Esta família de proteínas apresenta funções importantes em processos intracelulares incluindo progressão de ciclo celular, regulação de eventos de fosforilação, interação membrana-

citoesqueleto, transdução de sinais e metabolismo energético (ZIMMER et al., 1995; DONATO et al., 2001).

As proteínas S100A8 e S100A9 são altamente conservadas em sua estrutura, apresentando homologia na seqüência de seus aminoácidos entre 60 a 80% quando se comparam S100A8 e S100A9 de humano, rato e camundongo (EDGEWORTH et al., 1991). Ainda, é demonstrada funcionalidade equivalente entre S100A9 murina e humana no que se refere à localização celular, padrão de expressão, presença de isoformas, capacidade de interagir com a S100A8 e secreção (NACKEN et al., 2000).

A expressão da S100A8 e S100A9 é restrita a células da linhagem mielomonocítica e, sob certas circunstâncias, a queratinócitos (ZWADLO et al., 1988; HOGG et al., 1989). Das células circulantes apenas os neutrófilos e monócitos expressam S100A8 e S100A9, não sendo detectadas em linfócitos, plaquetas, basófios e eosinófilos (LAGASSE et al., 1988; HOGG et al., 1989). Dados mais recentes demonstraram a expressão do complexo S100A8/S100A9 por células endoteliais, onde a expressão da S100A9, em particular, foi observada após a estimulação das células endoteliais murinas com LPS, IL-1 ou TNF-α (YEN et al., 1997). A S100A8 e S100A9 são encontradas em altas concentrações no citoplasma de neutrófilos e monócitos, chegando a proporções de 30-60% das proteínas totais para neutrófilos e 1% para monócitos (EDGEWORTH et al., 1991; revisto por STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004). Macrófagos residentes não expressam S100A8 e S100A9, implicando na perda destas proteínas durante a diferenciação de monócitos em macrófagos. Macrófagos recém migrados expressam-nas durante um curto período de evolução do processo inflamatório (ZWADLO et al., 1988; HOGG et al., 1989). Tem sido demonstrada a expressão de S100A8/9 por macrófagos teciduais, em sítios de inflamação crônica, como por exemplo, em pacientes com artrite reumatóide, sarcoidose ou

45

tuberculose (ODINK et al., 1987; PALMER et al., 1987; ZWADLO et al., 1988). Ainda, foi demonstrada a dissociação da expressão destas proteínas no processo inflamatório crônico, onde apenas a S100A9 é expressa por células epitelióides de granuloma tuberculoso humano (DELABIE et al., 1990). Da mesma forma, foi demonstrado que células epitelióides de granuloma induzido por corpo estranho expressam seletivamente a proteína S100A9 (AGUIAR-PASSETI et al., 1997).

As proteínas S100A8 e S100A9 têm sido descritas como proteínas citoplasmáticas (EDGEWORTH et al., 1989), no entanto, foi demonstrado que na presença de inflamação ou após mobilização de cálcio estas proteínas são translocadas do citosol para componentes do citoesqueleto e membrana citoplasmática (ROTH et al., 1993; van den BOS et al., 1996). Nesse sentido, foi demonstrado que a S100A8 e S100A9 são secretadas por monócitos após ativação de proteína quinase C (PKC), por uma via dependente de microtúbulos intactos (RAMMES et al., 1997).

A presença de altas concentrações do complexo S100A8/S100A9 no soro, plasma, fluido sinovial, fezes e urina de pacientes portadores de diferentes patologias levaram à utilização da calprotectina como biomarcador laboratorial de processos inflamatórios, especialmente no diagnóstico de doenças inflamatórias não infecciosas como artrite, doença inflamatória intestinal e inflamação pulmonar crônica, uma vez que a presença de calprotectina indica a ativação de fagócitos de maneira mais sensível do que aquela detectada em outros exames laboratoriais (revisto por FOELL et al., 2004; revisto por STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004).

Com relação aos seus efeitos biológicos, foi demonstrado que o complexo S100A8/A9 pode ser encontrado no endotélio vascular em locais onde ocorre o influxo de leucócitos para o tecido lesado, sugerindo ação da calprotectina sobre a exsudação leucocitária (HOGG et al., 1989). Foi também demonstrado que a proteína S100A9 humana atua como moduladora da

afinidade de neutrófilos ao endotélio, via Mac-1 β2 integrina (NEWTON & HOGG, 1998). Em adição, foi demonstrado que a caprotectina aumenta a expressão/ativação de moléculas de adesão CD11b e ICAM-1 (EUE et al., 2000). Ainda, o anticorpo monoclonal anti-S100A9 murina bloqueia a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, induzido pela injeção intraperitoneal de glicogênio em camundongos (AMORIM-DIAS, M.A., 2001), bem como a migração de neutrófilos em resposta ao LPS, para o foco da lesão (VANDAL et al., 2003). Esses trabalhos sugerem o envolvimento do complexo S100A8/9, ou somente da S100A9, na interação célula mielóide-endotélio e na migração leucocitária. Foi também demonstrado que tanto a calprotectina, quanto a S100A9 isolada, controlam a reorganização de microtúbulos durante a migração transendotelial de fagócitos, sendo este processo dependente de cálcio (VOGL et al., 2004). Dados de literatura têm demonstrado um marcante efeito antiinflamatório da calprotectina em modelo de artrite induzida em ratos pelo adjuvante avidrina (BRUN et al., 1995). Em adição, a calprotectina, extracelularmente, interfere com o processo inflamatório modulando os estados de crescimento e sobrevivência de fibroblastos normais, sendo esses efeitos controlados fisiologicamente por íons metálicos (YUI et al., 1997). A calprotectina induz apoptose em células tumorais e este efeito é inibido pela presença de zinco, sendo que e em altas concentrações a S100A8/A9 inibe a produção in vitro de imunoglobulinas (Ig) das classes IgG, IgM e IgA (YUI et al., 1995; YUI et al., 2002). Trabalhos demonstraram que o heterodímero formado pela S100A8/9 se liga a ácidos graxos poliinsaturados, podendo assim atuar como ligante das enzimas metabolizadoras de ácido araquidônico e iniciar uma formação tardia de eicosanóides (KLEMPT et al., 1997; KERKHOFF et al., 1998). Neste sentido, foi sugerido que o complexo formado por S100A8/S100A9 e ácido araquidônico possa estar envolvido no mecanismo de transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (KANNAN, 2003). Foi

demonstrado também, que a calprotectina, a S100A8 e a S100A9 isoladas induzem quimiotaxia e migração *in vitro* de neutrófilos ao fibrinogênio e em ratos submetidos ao modelo de air pouch, sendo estes processos dependentes de cálcio (RYCKMAN et al., 2003).

A respeito das atividades biológicas observadas com a S100A9 isolada, é demonstrado que esta proteína está presente em altas concentrações em exsudato inflamatório induzido por carragenina em ratos (SHIBATA et al., 2004). Estes autores demonstram também que a S100A9 é capaz de estimular a proliferação *in vitro* de fibroblastos, sugerindo um papel da S100A9 na formação de tecido de granulação, pela estimulação do crescimento de fibroblastos. Ainda, camundongos *knockout* para S100A9 apresentam deficiência tanto no recrutamento de granulócitos, quanto na polimerização de tubulina (VOGL *et al.*, 2004). A S100A9, mas não a S100A8, é capaz de desativar macrófagos peritoneais ativados, além de inibir o burst respiratório dessas células (AGUIAR-PASSETI et al., 1997). Ainda a S100A9 estimula a proliferação de fibroblastos após inflamação induzida por carragenina, sugerindo uma ação durante o processo de cicatrização tecidual (SHIBATA et al., 2004), demonstrando que a proteína S100A9 desempenha papel chave na imunidade inata uma vez que é encontrada em abundância na resposta inflamatória (NACKEN et al., 2003; ROTH et al., 2003).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a proteína S100A9 possui potente atividade antinociceptiva em camundongos submetidos a um modelo experimental de avaliação da sensibilidade dolorosa (GIORGI et al., 1998). Ainda, foi demonstrado que a S100A9, secretada por neutrófilos, inibe a resposta dolorosa de camundongos, induzida pela injeção de glicogênio, carragenina ou zimosan e avaliados pelo teste das contorções abdominais (GIORGI et al., 1998; PAGANO RL, 2001; PAGANO et al., 2002; PAGANO et al., 2006). Dados obtidos por nosso grupo demonstraram que um peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) inibe a hiperalgesia inflamatória em animais submetidos a

diferentes modelos experimentais de avaliação da sensibilidade dolorosa (DALE et al., 2004; DALE et al., 2006a), inibe a hiperalgesia e alodinia em modelo de dor neuropática experimental (PACCOLA et al., 2004) e inibe a fagocitose de células peritoneais aderentes (PAGANO et al., 2005).

O peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 é composto pelos 19 aminoácidos correspondentes às posições 92-110 do domínio C-terminal desta proteína (HESSIAN et al., 1993; RAFTERY et al., 1996). Este peptídeo é caracterizado pela presença de uma região rica em histidina, referida como sítio ligante de zinco, localizada nas posições H¹⁰³-H¹⁰⁵ e pela presença do sítio ligante de ácido araquidônico (SOPALLA et al., 2002). Ainda, esta porção da S100A9 apresenta alta homologia à sua similar humana (RAFTERY et al., 1996) e ao domínio 5 do cininogênio de alto peso molecular humano (HESSIAN et al., 1995). Em adição, esta porção da molécula da S100A9 humana é idêntica ao N-terminal do NIF – Neutrophil Immobilizing Factor – (FREEMONT et al., 1989), o qual inibe a migração e quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos humanos em resposta ao N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e ao C5a do complemento (WATT et al., 1983). Dados recentes obtidos por nosso grupo demonstraram que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida por tripsina, uma serinoprotease capaz de ativar receptores ativados por protease do tipo 2 (DALE CS, 2002; DALE et al., 2006b).

1.3. Receptores Ativados por Proteases

Enzimas proteolíticas compreendem cerca de 2% do genoma humano (SOUTHAN, 2001), onde participam de uma série de processos fisiológicos que vão desde a degradação de proteínas da dieta no lúmem do trato gastrointestinal, ao controle do ciclo celular (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). Cinco classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas e identificadas como primordiais na catálise: as metaloproteaes, as serinoproteases, as

cisteínoproteases, as aspartilproteases e as teorinoproteases, as quais são classificadas de acordo com seus sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional (NEURATH, 1989). Embora proteases usualmente sejam vistas como enzimas degradativas, estudos recentes realizados com receptores ativados por proteases (Protease-activated receptors, PARs) têm levantado novas hipóteses sobre o potencial fisiológico e funcional de algumas enzimas como reguladoras de funções celulares, sendo que serinoproteases originadas da circulação (fatores de coagulação), de células inflamatórias (triptase de mastócitos, granzima A de neutrófilos e proteinase 3) e de tecidos epiteliais e neuronais (tripsina quaternária) podem regular células alvo especificamente pela clivagem e ativação desses receptores (revisto por VERGNOLLE et al., 2001a, revisto por BUNNET, 2006).

Os PARs pertencem a uma família de receptores acoplados a proteína G, os quais são ativados por serinoproteases e possuem pelo menos 4 tipos descritos até o momento, denominados de PAR₁ PAR₂, PAR₃ e PAR₄. Basicamente, para a ativação de PARs, serinoproteases clivam o receptor em sítios específicos presentes na porção N-terminal extracelular. Esta clivagem expõe uma nova seqüência N-terminal que atua como domínio ligante, o qual se liga às regiões que se mantiveram conservadas na segunda alça extracelular do receptor clivado, resultando na iniciação da transdução do sinal (Figura 3) (NYSTEDT et al., 1994; BOHM et al., 1996; HOLLENBERG et al., 1997; revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). Embora estes receptores possuam mecanismo similar de ativação (COUGHLIN & CAMERER, 2003), foi demonstrado que diferentes PARs apresentam diferentes funções biológicas e distribuição tecidual, os quais podem ser ativados por diferentes proteases. Nesse sentido, foi demonstrado que o PAR₁, PAR₃ e PAR₄ são ativados por trombina e a tripsina, triptase de mastócitos, protease 3 de neutrófilos, complexo fator tissular/fator VIIa/fator

50

Xa e serinoprotease 1 foram identificadas como ligantes para PAR₂ (COUGHLIN & CAMERER, 2003, revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004).



Figura 3. Domínios estruturais e funcionais de PARs. A figura mostra os alinhamentos para os domínios de PAR₁, PAR₂, PAR₃ e PAR₄ humanos. **A** e **B**: mecanismo de clivagem e interação da seqüência ligante com o domínio ligante extracelular. **C**: domínios funcionais importantes na porção amino-terminal, segunda alça extracelular e domínio carboxi-terminal. Os domínios conservados estão demonstrados em negrito. Adaptado de OSSOVSKAYA & BUNNET, 2006.

Peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios ligantes de PARs ativam os receptores diretamente sem a necessidade de hidrólise (Figura 3). Estes peptídeos (APs – activating peptides) são ferramentas úteis para o estudo das funções de PARs, uma vez que ativam

diretamente o receptor, sendo os efeitos observados decorrentes exclusivamente de sua ativação, podendo ser descartados outros efeitos que estejam sendo mediados pela ação da enzima ativadora sobre a homeostasia normal (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). Nesse sentido, têm sido demonstrada a participação de PARs em vários fenômenos fisiopatológicos, tais como na coagulação (PAR₁, 3 e 4), na estimulação de células inflamatórias (PAR₁, 2 e 4), na migração leucocitária (PAR₁ e 2), na cicatrização e reparo tecidual (PAR₁ e 2), no desenvolvimento de edema (PAR₁ e 2), no desenvolvimento da inflamação neurogênica (PAR₁ e 2), na sobrevivência neuronal (PAR₁), na nocicepção e na hiperalgesia (PAR₂) (VERGNOLLE et al., 2001b; revisto por VERGNOLLE et al., 2001a; revisto por BUNNET, 2006).

Muitas das proteases que ativam PARs são geralmente geradas durante a injúria e a inflamação. Dessa forma, os PARs estão diretamente envolvidos no desencadeamento das respostas dos tecidos a essas injúrias, incluindo alterações da homeostasia, a inflamação, a nocicepção e cicatrização (revisto por BUNNET, 2006). Ainda, foi demonstrado que a ativação de PARs induz os sinais clássicos da inflamação aguda, incluindo aumento da liberação de mediadores inflamatórios e de moléculas de adesão, vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e dor (MAJOR et al., 2003; VERGNOLLE et al., 2001a). Considerando a participação de PARs na modulação da resposta inflamatória, tem sido demonstrado que agentes pró-inflamatórios como TNF- α e LPS são capazes de estimular PAR₂ em células endoteliais (NYSTEDT & RAMAKRISHNAN, 1996), assim como endotoxinas estimulam PAR₂ no epitélio vascular (CICALA et al., 1999). Foi demonstrando também, que agonistas de PAR₁ e PAR₂ são capazes de relaxar vasos sanguíneos pré-contraídos, sendo este mecanismo dependente de óxido nítrico e da geração de produtos da cicloxigenase, demonstrando um efeito destes receptores na hiperemia (ROY et al., 1998; HAMILTON & COCKS, 2000; HAMILTON et al., 2001;

HAMILTON et al., 2002). Ainda, a injeção intraplantar de agonistas de PAR₁ e PAR₂ induzem a formação de edema na pata de ratos, sendo estes efeitos dependentes em grande parte à ativação de PARs nas fibras sensoriais, com consequente liberação de SP e CGRP, acarretando a formação de edema e hiperemia (VERGNOLLE et al., 1999; STEINHOFF et al., 2000; de GARAVILLA et al., 2001). Agonistas de PARs também induzem liberação de agentes vasoativos de mastócitos com efeitos diretos em células endoteliais (revisto por BUNNET et al., 2006). Ainda, em relação aos efeitos da ativação de PARs no processo inflamatório, foi demonstrado que trombina estimula rolamento e adesão de leucócitos em vasos mesentéricos, por ação em PAR₁ e PAR₄ (VERGNOLLE et al., 2002). De maneira similar, agonistas de PAR₂ estimulam rolamento, adesão e extravasamento de leucócitos em vasos mesentéricos, sendo este mecanismo dependente de fator ativador plaquetário (PAF) (VERGNOLLE, 1999a). Em adição, a tripsina, por uma ação em PAR₂, é capaz de ativar eosinófiolos e induzir a desgranulação destas células in vitro (MIIKE et al., 2001). Foi também demonstrado, que a ativação de receptores PAR₂ leva a um aumento da permeabilidade vascular e formação de edema na pata de ratos, com presença de infiltrado granulocítico, sendo este processo independente da ativação de mastócitos, produção de prostanóides e NO (VERGNOLLE et al., 1999).

A participação de PARs também foi demonstrada no desenvolvimento da inflamação neurogênica. Neurônios do gânglio da raiz dorsal expressam todos os 4 tipos de PAR (ZHU et al., 2005). Particularmente, o PAR₁ e o PAR₂ são coexpressos com SP e CGRP e a ativação de ambos receptores estimula a liberação de neuropeptídeos causando inflamação neurogênica em diversos tecidos incluindo a pele (da GARAVILLA et al., 2001; STEINHOFF et al., 2000) e os intestinos (CENAC et al., 2002; CENAC et al., 2003).

Em adição à sua participação na inflamação neurogênica, proteases podem estimular neurônios aferentes primários levando à liberação de SP e CGRP na medula espinhal, resultando

na transmissão central de mensagens nociceptivas. Particularmente o PAR2 apresenta papel importante na transmissão de mensagens nociceptivas (VERGNOLLE et al., 2001b; HOOGERWERF et al., 2001; KAWABATA et al., 2001; HOOGERWERF et al., 2004). Nesse sentido, foi demonstrado que a ativação de receptores PAR₂ induz hiperalgesia térmica em ratos e que este processo é independente da ativação de mastócitos (KAWABATA et al., 2001). Ainda, a injeção intraplantar de peptídeo agonista para PAR₂ (PAR₂AP) induz hiperalgesia térmica e mecânica em ratos, semelhante à induzida por tripsina e triptase, duas enzimas ativadoras de PAR₂ (VERGNOLLE et al., 2001b). Esses autores demonstraram também que camundongos knockout para PAR₂ não apresentam hiperalgesia mediante a injeção de PAR₂AP, ressaltando a importância destes receptores na modulação do processo de hiperalgesia (VERGNOLLE et al., 2001b). Ainda em relação aos efeitos do PAR₂ na nocicepção, foi demonstrado que a injeção intraplantar de concentrações subinflamatórias de peptídeo agonista de PAR₂ causa hiperalgesia mecânica e térmica de longa duração, além de ativar neurônios nociceptivos, demonstrado pelo aumento da expressão do proto-oncogene c-fos no corno dorsal da medula espinhal, e (VERGNOLLE et al., 2001b). Ainda, esta hiperalgesia não é observada em animais knockout para SP ou receptores NK1 e é prevenida pela administração intratecal de antagonistas de NK1 em animais normais, sugerindo que a hiperalgesia induzida por PAR₂ depende da liberação central de neuropeptídeos (VERGNOLLE et al., 2001b). Foi também demonstrado que a ativação de PAR₂ induz hiperalgesia térmica, dependente da sensibilização de receptor vanilóide de potencial transitório -1 (TRPV-1), um canal iônico não seletivo presente em nervos sensoriais que possui papel crítico no desenvolvimento da dor inflamatória (CATERINA et al., 1997). O efeito do PAR₂ também foi demonstrado em modelos de nocicepção visceral, onde a injeção de tripsina ou PAR₂AP, no ducto pancreático, estimula comportamento doloroso, bem como induz expressão de fos em neurônios espinhais

(HOOGERWERF et al., 2001; HOOGERWERF et al., 2004). Nesse sentido, foi demonstrado que a injeção intracolônica de PAR₂AP induz hiperalgesia em animais submetidos à modelo de distensão colônica (COELHO et al., 2002).

Apesar de vários estudos já terem sido realizados sobre a participação dos PARs em fenômenos fisiopatológicos, incluindo a inflamação e a transmissão de estímulos nociceptivos, não foi caracterizado até o momento um inibidor, seja endógeno ou exógeno, capaz de bloquear a ativação destes receptores. Assim, considerando-se que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida pela tripsina (DALE CS, 2002; DALE et al., 2006b), a qual é capaz de ativar PAR₂ (revisto por BUNNET, 2006), sem interferir com sua atividade enzimática, é plausível especular uma possível ação do peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S00A9 murina como um inibidor de ativação de receptores ativados por proteases do tipo 2.



2. OBJETIVOS

Com base nas observações que demonstram efeito inibitório da proteína S100A9, bem como de seu fragmento C-terminal (pS100A9m) sobre a nocicepção experimental (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2002; DALE et al., 2004; PAGANO et al., 2005; PACCOLA et al., 2004; DALE et al., 2006a/b; PAGANO et al., 2006) e considerando os dados que demonstram que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida por tripsina (DALE, CS, 2002; DALE et al., 2006b), uma serinoprotease capaz de ativar PAR₂ (revisto por BUNNET, 2006), o objetivo geral do presente trabalho é caracterizar o efeito antinociceptivo de peptídeos homólogos ao pS00A9m e avaliar os mecanismos envolvidos no efeito inibitório do pS100A9m e da menor seqüência ativa sobre a hiperalgesia induzida pela ativação de PAR₂.

Para tanto, os objetivos específicos são:

- Determinar a menor seqüência ativa homóloga ao C-terminal da proteína S100A9 capaz de induzir antinocicepção em ratos submetidos a modelo de hiperalgesia inflamatória;
- Avaliar o possível efeito inibitório do pS100A9m, bem como da menor seqüência ativa, na hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela ativação de PAR₂;
- Uma vez demonstrada a capacidade do pS100A9m e da menor seqüência ativa em inibir a hiperalgesia induzida por PAR₂, avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

Materíais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Planejamento Experimental

Para o estudo da relação estrutura/efeito do pS100A9m foram sintetizadas diferentes seqüências peptídicas homólogas ao pS100A9m, as quais foram avaliadas frente à hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina, em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata.

O estudo dos mecanismos envolvidos no efeito inibitório do pS100A9m, bem como da menor seqüência peptídica ativa ($AcE^{97}-G^{102}$), sobre a ativação de receptor ativado por proteases do tipo 2 (PAR₂) foi realizado empregando-se diferentes protocolos experimentais. Para se avaliar o efeito do pS100A9m e do $AcE^{97}-G^{102}$ sobre hiperalgesia induzida pela ativação de PAR₂, ratos foram submetidos ao modelo de pressão de pata e ao teste plantar, sendo que a ativação de PAR₂ foi induzida por um peptídeo seletivo agonista do receptor (PAR₂AP).

A avaliação da ativação neuronal induzida por PAR_2 e o efeito do pS100A9m sobre esta ativação, foram realizados por detecção da expressão do gene *egr-1*, um marcador de ativação neuronal, em ensaio de imuno-histoquímica no corno dorsal da medula espinhal de ratos injetados pela via intraplantar com PAR₂AP e/ou pS100A9m.

Uma vez observada a inibição pelo pS100A9m sobre a ativação neuronal induzida por PAR₂ foi avaliado o efeito deste peptídeo bem como do AcE⁹⁷-G¹⁰², sobre a ativação de neurônios sensoriais, empregando-se ensaio de influxo de cálcio em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG) de camundongos. As células, em cultura, foram estimuladas com PAR₂AP, tripsina, bradicinina, capsaicina ou cloreto de potássio (KCl) e avaliadas por microscopia de fluorescência. Em adição, foi avaliada a capacidade do pS100A9m em inibir a liberação de substância P induzida por PAR₂, realizada por ELISA em neurônios DRG estimulados com PAR₂AP.

Demonstrada a capacidade do pS100A9m e do AcE^{97} - G^{102} em inibir a ativação de neurônios DRG induzida por PAR₂, avaliou-se o efeito destes peptídeos sobre outras culturas celulares que expressam PAR₂. Para tanto, foram utilizadas células HEK-293, que naturalmente expressam PAR₂, ou células KNRK transfectadas com PAR₂. A avaliação do efeito do pS100A9mou do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio induzido em células HEK-293 ou KNRK-PAR₂ foi realizado por espectrometria, após estimulação com tripsina ou PAR₂AP.

Uma vez que o pS100A9m e o AcE⁹⁷-G¹⁰² não foram capazes de interferir com o influxo de cálcio nas células HEK-293 ou KNRK-PAR₂, decidiu-se avaliar se o efeito observado com o pS100A9m seria decorrente de uma inibição do cálcio intracelular. Sendo assim, neurônios DRG foram pré-tratados com tapsigaragina, um composto que depleta as células de cálcio intracelular e então estimulados com KCl e/ou pS100A9m e avaliados por microscopia de fluorescência. Para se avaliar o efeito do pS100SA9 sobre o transporte de cálcio sem a participação de canais, os neurônios DRG foram estimulados com ionóforo de cálcio e avaliados por microscopia de fluorescência.

Considerando-se que os dados obtidos sugeriam que o efeito do pS100A9m, sobre neurônios sensoriais, ocorresse por uma inibição do cálcio, os neurônios DRG foram submetidos a ensaio de eletrofisiologia onde foram medidas correntes de cálcio na presença, ou ausência, do pS100A9m.

Por fim, para a detecção dos tipos de canais de cálcio envolvidos no efeito inibitório do pS100A9m ou do AcE^{97} - G^{102} foi realizado ensaio de influxo de cálcio por microscopia de fluorescência em células HEK-tsA transfectadas com diferentes tipos de canais de cálcio. Para se confirmar os dados obtidos no ensaio de fluorescência, células HEK-tsA transfectadas com os distintos canais foram submetidas à eletrofisiologia, na presença de pS100A9m.

3.2. Animais

Ratos Wistar, machos, pesando entre 170 e 190 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Camundongos C57B1 pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Calgary. Os animais foram mantidos em local apropriado, com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}$ C), ciclo claro e escuro (12/12 horas), com livre acesso à água e ração por um período mínimo de três dias antes de serem utilizados nos experimentos. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia Institucional "Animal Care and Use Committee" e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal de ambas as Instituições.

3.3. Síntese dos peptídeos homólogos ao C-terminal da proteína S100A9

O peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 (H – E – K – L – H – E – N – N – P – R – G – H – G – H – S – H – G – K – G), bem como, os peptídeos homólogos a este, foram sintetizados em fase sólida pela técnica FMOC. As caracterizações e purificações destes peptídeos foram realizadas por HPLC e as massas determinadas por espectroscopia do tipo MALDI-TOF. Estes peptídeos foram sintetizados pelo Dr. Luiz Juliano e pela Dra. Maria Aparecida Juliano, no Departamento de Biofísica do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal Paulista (UNIFESP-EPM).

Os peptídeos homólogos ao pS100A9m correspondem a seqüências idênticas ao peptídeo H^{92} -G¹¹⁰, diferindo apenas em quantidade de aminoácidos, sendo as seqüências peptídicas utilizadas neste projeto identificadas pela sigla referente ao primeiro e último aminoácido sequenciado. As diferentes seqüências sintetizadas e avaliadas estão representadas na tabela 1.

| Sigla | Seqüência Peptídica | Quantidade de aminoácidos |
|--|--|---------------------------------|
| pS100A9m (H ⁹² -G ¹¹⁰) | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 19 |
| P ¹⁰⁰ -G ¹¹⁰ | H-E-K-L-H-E-N-N- P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 11 |
| H ⁹⁶ -G ¹¹⁰ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 15 |
| H ¹⁰⁷ -G ¹¹⁰ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S- H-G-K-G | 4 |
| $H^{92}-G^{102}$ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 11 |
| H ⁹² -S ¹⁰⁶ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 15 |
| H ⁹⁶ -G ¹⁰² | H-E-K-L- H-E-N-N-P-R-G -H-G-H-S-H-G-K-G | 7 |
| H ⁹² -E ⁹⁷ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 6 |
| E^{97} - G^{102} | H-E-K-L-H -E-N-N-P-R-G -H-G-H-S-H-G-K-G | 6 |
| H^{96} - R^{101} | H-E-K-L- H-E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 6 |
| H^{96} - P^{100} | H-E-K-L- H-E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 5 |
| E^{97} - R^{101} | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 5 |
| E ⁹⁷ -P ¹⁰⁰ | H-E-K-L-H- E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 4 |

Tabela 1. Seqüências peptídicas correspondentes ao C-terminal da proteína S100A9 murina

| $E^{97}-R^{101}COO^{-1}$ | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 5 |
|--------------------------------------|--|---|
| Ac H ⁹⁶ -P ¹⁰⁰ | H-E-K-L- H-E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 5 |
| Ac E ⁹⁷ -G ¹⁰² | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R-G -H-G-H-S-H-G-K-G | 6 |

3.4. Indução de hiperalgesia inflamatória

3.4.1. <u>Carragenina</u> - a carragenina (Sigma) foi dissolvida em solução de salina estéril na concentração de 200 μ g /100 μ L por animal e injetada pela via intraplantar (i.pl.), sendo os animais avaliados antes (medida inicial) e 3 horas após o tratamento (medida final), pico de hiperalgesia da carragenina nessa concentração (JORGE et al., 2006).

3.4.2. <u>Peptídeo agonista de PAR₂</u> - o peptídeo correspondente à seqüência ligante de PAR₂ (SLIGRL-NH₂ – PAR₂AP) foi diluído em solução estéril de salina e injetado i.pl. na concentração de 10 μ g/100 μ L por animal (VERGNOLLE et al., 2001b), sendo os animais avaliados antes (medida inicial) e em diferentes tempos após os tratamentos (medidas finais). Este peptídeo foi sintetizado no Departamento de Biofísica do INFAR-UNIFESP-EPM.

3.5. Avaliação da sensibilidade dolorosa

3.5.1. <u>Teste de pressão de pata de ratos</u> (Analgesy-Meter Hugo Basile®, Itália) - realizado de acordo com o método descrito por RANDALL & SELITTO (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), foi continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato. O teste foi interrompido quando o animal apresentou a reação de

"retirada" da pata pressionada. O limiar de dor foi representado como a força em gramas necessária para a indução da reação. O teste foi aplicado antes do início dos tratamentos (medida inicial) e em diferentes tempos (medida final) após a indução da hiperalgesia inflamatória. Os resultados foram analisados pela comparação das médias das medidas inicias e finais ou, comparando-se as medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.5.2. <u>Teste plantar</u> (Analgesy-Meter Hugo Basile®, Itália) - realizado de acordo com o método descrito por HARGREAVES et al. (1988). Este teste utiliza como estímulo nociceptivo o calor induzido por energia radiante. A hiperalgesia térmica foi definida como a latência, em segundos, da permanência da pata dos animais sobre um foco de luz radiante, com temperatura constante de 50±1°C. Os animais foram avaliados antes do início dos tratamentos (medida inicial), a fim de se estabelecer uma medida inicial entre 6 e 8 segundos e em diferentes tempos (medida final) após a indução da hiperalgesia inflamatória. Os resultados foram analisados pela comparação das médias das medidas inicias e finais ou, comparando-se as medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.6. Tratamento com os peptídeos sintéticos

Para os ensaios de avaliação da relação estrutura/ efeito do C-terminal da proteína S100A9 murina sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, as diferentes seqüências peptídicas sintetizadas (tabela 1) foram diluídas em salina, no momento do uso, em diferentes concentrações e injetadas em ratos, pela via intraplantar, concomitante a 200 μ g de carragenina (volume final 100 μ L), sendo os animais avaliados no modelo de pressão de pata antes (medida inicial) e 3 h após os tratamentos (medida final). Uma vez que a concentração efetiva do pS100A9m no modelo

de hiperalgesia induzida por carragenina é 5 μ M (1 μ g/pata) (DALE et al. 2006a), procurou-se utilizar, para todas as seqüências avaliadas, a menor concentração capaz de inibir a hiperalgesia induzida por este agente inflamatório, de maneira semelhante ao observado para o pS100A9m. Em todos os experimentos realizados, animais injetados apenas com carragenina foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle.

Para a avaliação do efeito do pS100A9m e do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela ativação de PAR₂, o PAR₂AP foi injetado pela via intraplantar, na concentração de 10 μ g/100 μ L. O pS100A9m, nas concentrações de 1, 4 ou 8 μ g ou o AcE⁹⁷-G¹⁰², na concentração de 1 μ g (10 μ M) foram injetados concomitantes ou 30 min antes do PAR₂AP. Ainda, num terceiro protocolo o pS100A9m e o AcE⁹⁷-G¹⁰² foram injetados 1 h após o PAR₂AP. Em todos os protocolos os animais foram avaliados no modelo de pressão de pata antes (medida inicial) e em diferentes tempos após os tratamentos. Animais injetados apenas com PAR₂AP foram avaliados como grupo controle.

Para a avaliação do efeito do pS100A9m e do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia térmica induzida pela ativação de PAR₂, o PAR₂AP foi injetado pela via intraplantar, na concentração de 10 µg. O pS100A9m, nas concentrações de 0,1, 1 ou 20 µg ou o AcE^{97} - G^{102} , na concentração de 1 µg foram injetados concomitante ou 30 min antes do PAR₂AP. Ainda, em um terceiro protocolo experimental, o pS100A9m e o AcE^{97} - G^{102} foram administrados 1 h após o PAR₂AP. Em todos os protocolos os animais foram avaliados no teste plantar antes (medida inicial) e em diferentes tempos após os tratamentos. Animais injetados apenas com PAR₂AP foram avaliados como grupo controle.

3.7. Marcação de ativação celular por imuno-histoquímica

A marcação de ativação celular foi realizada por imuno-histoquímica pela detecção da expressão da proteína Egr-1(produto de transcrição do gene *egr-1*, um marcador de ativação neuronal) no corno dorsal da medula espinhal de ratos.

Após 3 horas da administração intraplantar de PAR₂AP (10 µg) ou associação de PAR₂AP a 4 µg de pS100A9m, ratos foram anestesiados profundamente com uma associação de quetamina e xilazina (1:1; 100 µL/ 100 g), sendo então realizada perfusão sistêmica, por uma cânula introduzida no ventrículo esquerdo, com 300 mL de salina tamponada de fosfato e em seguida com 300 mL de fixador (paraformaldeído 4% em PB 0,1 M). Imediatamente após, foi realizada a retirada das medulas espinhais, na altura das lâminas 4 e 5, as quais permaneceram no mesmo fixador por no mínimo 5 horas e em seguida foram "crioprotegidas" por 24 horas, em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato. As medulas foram emblocadas em gelatina e cortadas por congelação (30 µm), sendo os cortes coletados em PB. A seguir, os cortes foram lavados em PB 0.1 M (3 vezes por 10 minutos) e incubados por 12 horas com anticorpo anti-egr (Calbiochem -1:200). Após esta incubação, os cortes foram novamente lavados (3 vezes por 10 minutos) e incubados por 2 horas com o anticorpo secundário biotinilado (Jackson, 1:200). Em seguida, os cortes foram novamente lavados (3 vezes por 10 minutos) e incubados com avidina (1:100) e biotina (1:100) por 2 horas. Após este procedimento foi realizada a revelação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizando-se diaminobenzidina como cromógeno. As lâminas foram montadas e a localização de corpos celulares contendo a proteína Egr-1, em regiões específicas da medula espinhal, foi realizada em microscopia convencional de luz, sendo sua quantificação realizada por meio de análise de imagens auxiliada por computador, empregando-se o programa Image Pro-Plus.

Grupos de ratos injetados com salina ou apenas com pS100A9m, ou ainda grupos de animais sem tratamento (branco), foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como controles.

3.8. Avaliação de ativação celular pela mobilização de cálcio em células HEK-293 (Human embryonic Kidney 293 cells) ou células KNRK-PAR₂ (Kirsten virus-transformed kidney – PAR₂ transfected cells)

Células HEK-293 ou células KNRK-PAR₂ foram cultivadas em DMEM (Dubelco`s Modified Eagle Medium - Gibco, Invitrogen – USA), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de solução penicilina-streptomicina (PSS - Sigma,USA) e 1% de Piruvato de sódio (PY; Sigma). Para as células KNRK-PAR₂ foi adicionado também 1% de geneticina (50 mg/ mL - Gibco, Invitrogen – USA). As células foram cultivadas por um período de 2 a 3 dias até obterem 95% de confluência, para serem utilizadas nos experimentos.

Para a realização do ensaio de sinalização de cálcio, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas com PBS (5 mL) e ressuspendidas em 5 mL de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas por 10 min (1000 rpm) e os "pellets" ressuspendidos em 1mL de meio DMEM e carregados com indicador de cálcio (fluo 3 -AM ester - Molecular Probes) na concentração final de 22 μ M (25 μ g/mL). Após a incubação por 25 minutos na presença de 0,25 mM de sulfinpirazona (Sigma) as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão de corrida de cálcio, pH 7.4. As medidas de fluorescência refletindo elevações de cálcio intracelular foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômeto de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480nm e emissão de 530nm.

Tripsina e/ ou PAR₂AP foram utilizados como estímulo para elevação de cálcio nas concentrações que se seguem:

- células HEK-293: PAR₂AP – 50 μ M; tripsina – 5 U

- células KNRK-PAR₂: PAR₂AP $- 5 \mu$ M; tripsina - 1 U

Ionóforo de cálcio (2 μ M Sigma – USA) foi utilizado como controle positivo de ativação celular.

Para cada tipo celular foram realizados, pelo menos, 4 experimentos em culturas distintas de HEK-293 ou KNRK-PAR₂. O pS100A9m foi adicionado às células, na concentração de 50 μM, concomitante ao agente estimulante ou 10 min antes do estímulo com tripsina ou PAR₂AP.

3.9. Secreção de Substância P

Neurônios DRG foram extraídos das regiões toráxica e lombar da medula espinhal de camundongos e foram mantidos em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution – Sigma, USA). Após a coleta, as células foram incubadas por 10 min à 37°C em HBSS contendo 1% de papaína (Worthington, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá). Após a incubação, as células foram lavadas com meio filtrado Leibovitz's L-15 (contendo: 200 mM de glutamina, 20% de glicose e 10% de soro fetal bovino) e novamente incubadas por 10 min à 37°C com HBSS contendo colagenase (1 mg/ mL, Sigma) e dispase (4mg/ mL, Sigma) para digestão das células. Após este período, as células foram colocadas em cultura em placas de Petri (35 mm de diâmetro; MatTek Corporation, Ashland, MA) cobertas com matrigel (BD Biosciences, Belford, MA) contendo 2 mL de meio de cultura completo (MEM – Minimum Essential Medium - contendo: 2.5% de FBS, 1% de PSS, 200 mM de gutamina, 1% de dextrose e 10 μM de ARAC (Cytosina β – D – arabino – furanoside – hidrochlorido), 5 – fluoro – 2 – desoxi - uridina (FUDR) e uridina; Sigma). Para a detecção de secreção de SP, as células foram incubadas por 5 min à 37°C com HBSS ou com HBSS contendo: 100 μM de LRGILS (peptídeo reverso, controle do PAR₂AP – Ezbiolab Inc, Westfield, IN, USA),

ou 100 µM de PAR₂AP, ou 50 µM de pS100A9m ou associação de PAR₂AP e pS100A9m. A SP foi dosada nos sobrenadantes das células utilizando-se kit enzimático de imuno-ensaio (Assay Design, Ann Arbor, Michigan, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.10. Expressão de canais de cálcio recombinantes

Células HEK tsA-201 foram cultivas como descrito por BEEDLE et al. (2004), com a excessão de que as células não foram colocadas à 28°C após a transfecção. As células foram repicadas em placas de Petri cobertas com lamínulas de vidro. O cDNA de canais de cálcio dependentes de voltagem (HVA; high voltage activated) Cav1.2 e Cav2.2 foram transfectados pelo método de fosfato de cálcio, a uma relação de 1:1:1 para cálcio α 1, α 2- δ 1 e β 1 β (2 μ g cada). As células foram utilizadas para ensaio de mobilização de cálcio após 24-48 h da transfecção. A transfecção dos canais foi realizada pelo Dr. Christophe Altier do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Calgary, Canadá.

3.11. Avaliação de ativação celular pela da mobilização de cálcio em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG) ou células HEK-tsA

Neurônios DRG foram extraídos e cultivados como descrito no item 3.9. As células HEKtsA recombinates foram obtidas como descrito no item 3.10.

Para o ensaio de ativação celular, as culturas de DRG ou HEK-tsA foram lavadas 2 vezes com 1 mL de HBSS 1x, livre de cálcio e magnésio, e incubadas por 1 hora com 2 mL de HBSS 1x, suplementado com 0,1% albumina (Sigma) e carregados com 5 µM de indicador de cálcio (fluo 3-AM ester). Após a incubação, as culturas foram lavadas 2 vezes e ressuspendidas em 2 mL de tampão de corrida de cálcio. Medidas de fluorescência refletindo elevações de cálcio intracelular, em células individuais, foram conduzidas a 460-490 nm de excitação e 515 nm de emissão utilizando-se software OpenLab para Macintosh.

Para a realização dos ensaios de sinalização de cálcio nos neurônios DRG as células foram estimuladas pela administração aguda de 100 μ M de PAR₂AP, ou 2,5 U/ mL de tripsina, ou 100 nM de capsaicina (Sigma, USA), ou 10 nM de bradicinina (Sigma, USA) ou 50 mM de KCl (Sigma, USA). O pS100A9m nas concentrações de 0,5; 5; 50 ou 100 μ M, ou o AcE⁹⁷-G¹⁰² nas concentrações de 1 ou 10 μ M foram adicionado às células concomitante ao agente estimulante.

Para a detecção de inibição de cálcio intracelular os neurônios foram pré-incubados com tapsigaragina (5 min, 250 nM, Sigma) e então estimulados com KCl ou KCl concomitante ao pS100A9m. No ensaio de transporte de cálcio sem a participação de canais, os neurônios foram estimulados com ionóforo de cálcio (2 μ M, Sigma) ou ionóforo de cálcio concomitante ao pS100A9m.

Para ensaios de mobilização de cálcio nas células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio, estas foram estimuladas com KCl ou KCl concomitante ao pS100A9m (0,1; 0,5; 1; 5; 5 ou 50μ M).

3.12. Eletrofisiologia

Medidas de eletrofisiologia para neurônios DRG e células HEK tsA-tranfectadas foram conduzidas de acordo com o método descrito por (BEEDLE et al., 2004), utilizando-se bario 20 mM como o carregador de voltagem. As células foram conduzidas à -100 mV e relações de corrente-voltagem foram adquiridas medindo-se diferentes potenciais teste. Para a gravação de correntes de cálcio em neurônios DRG e/ ou células tsA-tranfectadas as relações de voltagem/corrente foram obtidas realizando-se vários potencias teste de 0 à +10 mV. Para a realização dos experimentos com neurônios DRG, as células foram mantidas em tampão de

gravação contendo: 2 mM de CaCl2, 10 mM de HEPES, 160 mM de TEACl e 10 mM de glicose. Para as células HEK-tsA-201 transfectadas foi utilizado tampão contendo: 20 mM de BaCl₂, 1mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, 40 mM de TEACl, 10 mM de glicose, CsCl (HVA- 65mM) ou 2 mM de BaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, 40 mM de TEACl, 10 mM de glicose e CsCl (LVA - 105mM). Pipetas de vidro de borosilicato (2-4 MΩ) foram preenchidas com solução interna contendo: CsCl (110 mM), MgCl₂ (3 mM), EGTA (10 mM), HEPES (10 mM), MgATP (3 mM) e GTP (0,6 mM), pH 7.2 (para DRGs) ou CsMeSO4 (108 mM), MgCl₂ (4 mM), EGTA (9 mM), HEPES (9 mM), MgATP (2.6 mM) e LiGTP (0,6 mM), pH 7.2 (para HEK tsA-201). Os experimentos foram realizados em aplificador Axopatch 200B (Molecular Devices). A freqüência de aquisição dos dados foi de 10 kHz e os dados foram filtrados à 2 kHz. Os dados foram analisados utilizando-se pClamp 9 (Molecular Devices). O peptídeo mS100A9p foi preparado no momento do uso e diluído em tampão de gravação a partir de soluções estoque congeladas de 1 mM, sendo aplicado às células na concentração de 50 μ M, para DRG e 25 μ M, para HEK-tsA, por microperfusão. As correntes foram elicitadas a partir de um potencial de repouso de -60 mV (DRGs) ou -100 mV (células tsA-201). Os experimentos de eletrofisiologia foram realizados em colaboração com o Dr. Christophe Altier do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Calgary, Canadá.

3.13. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA). A análise estatística foi gerada utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.0. A comparação estatística para mais de dois grupos foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguida de Bonferroni. A comparação
estatística para diferentes grupos estudados ao longo do tempo foi realizada por ANOVA de duas vias (para medidas repetidas), seguida pelo teste de Bonferroni de múltiplas comparações. Em todos os casos o índice mínimo de significância considerado foi de p<0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da relação estrutura/efeito do C-terminal da proteína S100A9 sobre a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata

Inicialmente, foram sintetizadas 3 seqüências peptídicas, correspondentes aos aminoácidos da região C-terminal do pS100A9m: o H⁹⁶-G¹¹⁰, o P¹⁰⁰-G¹¹⁰ e o H¹⁰⁷-G¹¹⁰. Para cada seqüência avaliada, grupos de ratos receberam injeção intraplantar de diferentes concentrações dos peptídeos, concomitante a 200 µg de carragenina. Os animais foram avaliados antes e 3 h após os tratamentos. Os resultados obtidos demonstraram que o H⁹⁶-G¹¹⁰, na concentração de 3 µM, reverteu a hiperalgesia induzida pela carragenina (Figura 4A). O P¹⁰⁰-G¹¹⁰ na concentração de 5 µM, não interferiu com a hiperalgesia induzida pela carragenina, enquanto que a concentração de 50 µM foi capaz de reverter este efeito. Quando o P¹⁰⁰-G¹¹⁰ foi avaliado na concentração de 1 mM, além de reverter a hiperalgesia, induziu uma aumento no limiar de resposta dos animais em cerca de 40% (Figura 4B). O H¹⁰⁷-G¹¹⁰, por sua vez, não interferiu com a hiperalgesia induzida pela carragenina de socentrações avaliadas (Figura 4C).

Partindo-se destes resultados, foram então sintetizadas as seqüências denominadas H^{92} -S¹⁰⁶ e H^{92} -G¹⁰², tendo-se como base os aminoácidos da região N-terminal do pS100A9m. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a seqüência H^{92} -S¹⁰⁶ quanto o H^{92} -G¹⁰² foram capazes de inibir a hiperalgesia induzida pela carragenina (Figura 5^a/B). No entanto, o H^{92} -S¹⁰⁶ reverteu a hiperalgesia apenas na concentração de 20 µM, enquanto que a concentração de 5 µM não induziu nenhum efeito (Figura 5A). Por outro lado, o H^{92} -G¹⁰², na concentração de 7,5 µM, além de inibir a hiperalgesia, induziu um aumento no limiar de reposta dos animais em cerca de 40% (Figura 5B). Uma vez que o H⁹²-G¹⁰² induziu antinocicepção na concentração de 7,5 μ M, decidiu-se sintetizar seqüências intermediárias a este peptídeo, que foram denominadas: H⁹²-E⁹⁷ e E⁹⁷-G¹⁰². Os resultados obtidos demonstraram que o H⁹²-E⁹⁷, embora fosse capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela carragenina, a concentração necessária para induzir este efeito foi de 100 μ M (Figura 6A). Já, o E⁹⁷-G¹⁰² reverteu a hiperalgesia na concentração de 5 μ M (Figura 6B). Ainda, além de reverter a hiperalgesia induzida pela carragenina, este peptídeo, na concentração de 15 μ M, induziu um aumento de 40% no limiar de reposta dos animais (Figura 6B). Dessa forma, esta foi a seqüência escolhida para as sínteses subseqüentes.

Foram então sintetizadas as seqüências denominadas H^{96} - R^{101} , H^{96} - G^{102} , E^{97} - P^{100} , H^{96} - P^{100} e E^{97} - R^{101} . Todas as seqüências avaliadas foram capazes de induzir inibição da hiperalgesia, no entanto, o H^{96} - R^{101} , o H^{96} - G^{102} e o E^{97} - P^{100} só foram efetivos em concentrações a partir de 50 µM (Figura 7A, B, C). Por outro lado, as seqüências H^{96} - P^{100} e E^{97} - R^{101} reverteram a hiperalgesia induzida pela carragenina na concentração de 15 µM (Figura 8A, B). O passo seguinte foi testar o E^{97} - R^{101} COO⁻, que diferente da seqüência citada acima, possui a região carboxi-terminal livre. Contudo, esta manipulação levou a uma diminuição da potência do efeito deste peptídeo, uma vez que o mesmo (E^{97} - R^{101} COO⁻) só foi efetivo na concentração de 60 µM (Figura 9). Sendo assim, decidiu-se pela acetilação do aminoácido inicial das seqüências peptídicas mais ativas. Os resultados obtidos demonstraram que os peptídeos AcH⁹⁶- P^{100} e Ac E^{97} - G^{102} inibiram a hiperalgesia induzida pela carragenina nas concentrações de 16 e 10 µM, respectivamente (Figura 10A, B).

A seqüência AcE^{97} - G^{102} , a qual apresentou efeito inibitório similar ao observado com o pS100A9m, foi empregada nos experimentos subseqüentes. Os resultados obtidos com as diferentes seqüências peptídicas avaliadas estão resumidos na tabela 2.



Figura 4. Efeito do H^{96} - G^{110} , P^{100} - G^{110} ou H^{107} - G^{110} sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (A) o H^{96} - G^{110} foi injetado i.pl. na concentração de 3 µM concomitante à Cg (200 µg/ 100 µl). Em (B) o P^{100} - G^{110} foi injetado nas concentrações de 5, 50 µM ou 1 mM concomitante à Cg e em (C) o H^{107} - G^{110} foi injetado nas concentrações de 5 ou 50 µM concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com Cg e (***) p<0,001 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 5. Efeito do H^{92} -S¹⁰⁶ ou H^{92} -G¹⁰² sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (**A**) o H^{92} -S¹⁰⁶ foi injetado i.pl. nas concentrações de 5 ou 20 µM concomitante à Cg (200 µg/ 100 µl). Em (**B**) o H^{92} -G¹⁰² foi injetado na concentração de 7,5 µM concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 6. Efeito do $H^{92}-E^{97}$ ou $E^{97}-G^{102}$ sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (**A**) o $H^{92}-E^{97}$ foi injetado i.pl. nas concentrações 5, 50 ou 100 µM concomitante à Cg (200 µg/100 µl). Em (**B**) o $E^{97}-G^{102}$ foi injetado nas concentrações de 5 ou 15 µM concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 7. Efeito do H⁹⁶-R¹⁰¹, H⁹⁶-G¹⁰² ou E⁹⁷-P¹⁰⁰ sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (**A**) o H⁹⁶-R¹⁰¹ foi injetado i.pl. nas concentrações de 5 ou 50 μ M concomitante à Cg (200 μ g/ 100 μ l). Em (**B**) o H⁹⁶-G¹⁰² foi injetado nas concentrações de 50 ou 100 μ M concomitante à Cg e em (**C**) o E⁹⁷-P¹⁰⁰ foi injetado nas concentrações de 50 ou 100 μ M concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com Cg e (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 8. Efeito do H⁹⁶-P¹⁰⁰ ou E⁹⁷-R¹⁰¹ sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (**A**) o H⁹⁶-P¹⁰⁰ foi injetado i.pl. nas concentrações de 15 ou 50 μ M concomitante à Cg (200 μ g/100 μ l). Em (**B**) o E⁹⁷-R¹⁰¹ foi injetado nas concentrações de 15 ou 50 μ M concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial e (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 9. Efeito do E^{97} -R¹⁰¹COO⁻ sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). O E^{97} -R¹⁰¹COO⁻ foi injetado i.pl. nas concentrações de 5 ou 60 µM concomitante à Cg (200 µg/100 µl). Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injeados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.



Figura 10. Efeito do AcH⁹⁶-P¹⁰⁰ ou AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina (Cg). Em (**A**) o AcH⁹⁶-P¹⁰⁰ foi injetado i.pl. na concentração de 16 μ M concomitante à Cg (200 μ g/100 μ l). Em (**B**) o AcE⁹⁷-G¹⁰² foi injetado na concentração de 10 μ M concomitante à Cg. Os animais foram avaliados antes (tempo 0) e 3 horas após os tratamentos. Animais injetados apenas com Cg foram avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, e (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com Cg.

| Sigla | Seqüência Peptídica | Concentração Efetiva | Quantidade de aminoácidos |
|---|--|-------------------------|---------------------------------|
| pS100A9m | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 5 µM | 19 |
| $H^{96}-G^{110}$ | H-E-K-L- H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 3 μΜ | 15 |
| P^{100} - G^{110} | H-E-K-L-H-E-N-N- P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 1 mM | 11 |
| H^{107} - G^{110} | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S- H-G-K-G | Sem efeito | 4 |
| H^{92} -S ¹⁰⁶ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 20 µM | 15 |
| H ⁹² -G ¹⁰² | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 7,5 μM | 11 |
| $H^{92}-E^{97}$ | H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 100 µM | 6 |
| E ⁹⁷ -G ¹⁰² | Н-Е-К-L-Н -Е-N-N-Р-R-G -Н-G-Н-S-Н-G-К-G | 15 µM | 6 |
| $H^{96}-R^{101}$ | H-E-K-L- H-E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 50 µM | 6 |
| H^{96} - G^{102} | H-E-K-L- H-E-N-N-P-R-G -H-G-H-S-H-G-K-G | 50 µM | 7 |
| E^{97} - P^{100} | H-E-K-L-H- E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 50 µM | 4 |
| H^{96} - P^{100} | H-E-K-L- H-E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 16 µM | 5 |
| E ⁹⁷ -R ¹⁰¹ NH ₂ | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 15 µM | 5 |
| E^{97} - $R^{101}COO^{-1}$ | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R -G-H-G-H-S-H-G-K-G | 60 µM | 5 |
| Ac H ⁹⁶ -P ¹⁰⁰ | H-E-K-L- H-E-N-N-P -R-G-H-G-H-S-H-G-K-G | 16 µM | 5 |
| Ac E ⁹⁷ -G ¹⁰² | H-E-K-L-H- E-N-N-P-R-G -H-G-H-S-H-G-K-G | 10 µM | 6 |

 Tabela 2. Seqüências peptídicas homólogas ao C-terminal da proteína S100A9 murina e

 respectivas concentrações efetivas no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina

Os diferentes peptídeos foram testados em ratos, submetidos ao modelo de pressão de pata, na presença de hiperalgesia induzida pela carragenina. Em negrito estão representadas as seqüências que apresentaram efeito inibitório nas menores concentrações molares.

4.2. Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo pS100A9m – Ação sobre PAR₂

4.2.1. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP – Tratamento concomitante

Ratos receberam injeção intraplantar (i.pl.) de PAR₂AP na concentração de 10 μ g/100 μ L, concomitante a 1, 4 ou 8 μ g de pS100A9m. O limiar nociceptivo, em resposta a estímulo mecânico, foi medido antes e após diferentes tempos do tratamento com o peptídeo. O PAR₂AP induziu diminuição significativa do limiar nociceptivo, característico de hiperalgesia mecânica (Figura 11). O tratamento com o pS100A9m foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida por PAR₂ em todas as concentrações testadas, sendo que com a menor concentração (1 μ g) essa inibição foi cerca de 54% apenas na primeira hora. Já, as concentrações maiores (4 e 8 μ g) reduziram a hiperalgesia entre a 1^a e a 3^a h, sendo que na terceira, hora essa inibição foi em torno de 60% e 81%, para as concentrações de 4 e 8 μ g, respectivamente (Figura 11).

4.2.2. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP – Tratamento prévio

O pré-tratamento com o pS100A9m, 30-min antes da injeção i.pl. de PAR₂AP, também reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista (Figura 12). Neste caso, o pS100A9m na concentração de 1 μ g inibiu a hiperalgesia em cerca de 45% e 48% na primeira e segunda horas de avaliação, respectivamente; a concentração 4 μ g de pS100A9m inibiu a hiperalgesia em 67% na primeira hora, 97% na segunda hora e 65% na terceira hora, e a

concentração de 8 μ g de pS100A9m inibiu a hiperalgesia induzida por PAR₂AP em 60% na primeira hora, 100% na segunda hora e em 50% na terceira hora de avaliação (Figura 12).

4.2.3. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP – Pós tratamento

Quando o pS100A9m foi injetado, i.pl., nas concentrações de 1 ou 4 μ g, 1 h após o PAR₂AP, não foi mais observado efeito inibitório sobre a hiperalgesia mecânica, quando comparado com o grupo controle, tratado apenas com PAR₂AP (Figura 13).

4.2.4. <u>Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP – Tratamento</u> <u>concomitante</u>

De maneira similar ao observado na hiperalgesia mecânica, a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP foi significativamente reduzida pela administração i.pl. concomitante de pS100A9m (Figura 14). Todas as concentrações testadas (0,1; 1 e 20 μ g) de pS100A9m inibiram a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP nas primeiras 2 horas de avaliação. Ainda, com as maiores concentrações de pS100A9m (1 e 20 μ g), o pS100A9m além de reverter a hiperalgesia, induziu um aumento no limiar nociceptivo, de 50 e 20% para as doses de 1 e 20 μ g, respectivamente, quando o teste foi aplicado 1 h após o tratamento (Figura 14).

4.2.5. <u>Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP – Tratamento prévio</u>

O pré-tratamento com o pS100A9m, 30 min antes da injeção i.pl. de PAR₂AP, também causou inibição da hiperalgesia térmica, observada apenas na primeira hora e com as duas concentrações mais altas (Figura 15).

4.2.6. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP – Pós tratamento

Como o observado na hiperalgesia mecânica, o pós-tratamento com pS100A9m, nas concentrações de 1 e 20 μ g, não interferiu com a hiperalgesia induzida por PAR₂AP (Figura 16).

4.2.7. Efeito do pS100A9m sobre a expressão de Egr-1 induzida por PAR₂AP

Uma vez que a literatura demonstra que a injeção i.pl. de PAR₂AP induz ativação neuronal, quantificada pela expressão de Fos na medula de ratos (VERGNOLLE et al., 2001b), decidiu-se avaliar o efeito da administração i.pl. de PAR₂AP sobre a expressão de *egr-1*, um outro marcador de ativação neuronal, pela marcação da proteína Egr-1, seu produto de ativação, na presença ou ausência de pS100A9m. A administração i.pl. de 10 μ g de PAR₂AP induziu um aumento na expressão de Egr-1 de 56%, na lâmina superficial da medula espinhal de ratos, 3 horas após sua injeção (Figura 17). O tratamento concomitante com 4 μ g de pS100A9m inibiu significativamente o número de núcleos imuno-marcados para Egr-1, enquanto que o pS100A9m, por si só, não alterou essa marcação em condições basais (Figura 17).

4.2.8. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais

Observada a inibição de Egr-1, na medula espinhal de ratos, pelo pS100A9m, avaliou-se o efeito desse peptídeo sobre o influxo de cálcio induzido por agonistas de PAR₂ em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG) de camundongos. Neurônios DRG foram estimulados por tratamento agudo com dois agonistas de PAR₂: tripsina (5 U, Figura 18) ou PAR₂AP (100 μ M, Figura 19) ou pela associação destes agonistas ao pS100A9m, nas concentrações de 0,5; 5; 50 ou 100 μ M. Todas as concentrações do pS100A9m testadas inibiram significativamente a magnitude do influxo de cálcio nos neurônios DRG em resposta à tripsina (5 U) (Figura 18). O pS100A9m também inibiu significativamente a magnitude do influxo de cálcio 100 μ M (11%), 50 μ M (13%) ou 100 μ M (9%, Figura 19).

4.2.9. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-293 e células KNRK-PAR2

Uma vez que o pS100A9m inibiu significativamente tanto a hiperalgesia resultante da ativação de PAR₂, quanto à liberação de cálcio em neurônios sensoriais induzida pela ativação deste receptor, decidiu-se avaliar o efeito do pS100A9m peptídeo em outros tipos celulares que expressam PAR₂. Para tanto, foram utilizadas células HEK-293, que naturalmente expressam PAR₂, e células KNRK transfectadas com PAR₂ (KNRK-PAR₂), ou células não transfectadas e foi avaliado o efeito do pS100A9m sobre a mobilização de cálcio nestas células. Em células HEK-293 estimuladas com tripsina (5 U), tanto o tratamento concomitante, quanto o pré-

tratamento (10 min) com o pS100A9m (50 μ M), não interferiu com o influxo de cálcio induzido pelo estímulo (Figura 20). De maneira similar, a resposta a estas células também não foi modificada pelo pS100A9m, quando o estímulo foi realizado com o peptídeo agonista de PAR₂ (50 μ M; Figura 21).

Assim como o observado para células HEK-293, nenhuma modificação significativa do influxo de cálcio, induzido por tripsina (5 U) ou PAR₂AP (5 μ M), foi observada em células KNRK-PAR₂ frente ao tratamento com 50 μ M de pS100A9m (Figuras 22 e 23).

As células KNRK não transfectadas com PAR₂ não apresentaram resposta significativa ao estímulo com PAR₂AP ou tripsina (dados não mostrados).

4.2.10. Efeito do pS100A9m sobre a liberação de substância P (SP) induzida pela ativação de PAR₂ em neurônios sensoriais

Uma vez que o pS100A9m inibiu a sinalização induzida por PAR₂ em neurônios sensoriais, mas não em outros tipos celulares, decidiu-se avaliar se o pS100A9m poderia ou não interferir com a liberação de SP após a ativação do PAR₂. A incubação de neurônios sensoriais, na presença do peptídeo agonista de PAR₂ (100 μ M), induziu aumento significativo na liberação de SP, quando comparado aos efeitos observados com o peptídeo controle inativo LRGILS-NH₂ (100 μ M; Figura 24). O pS100A9m (50 μ M) inibiu os efeitos do peptídeo agonista de PAR₂ sobre a liberação de substância P. Já o pS100A9m, por si só, não induziu nenhum efeito sobre a liberação deste neurotransmissor, pelos neurônios sensoriais (Figura 24).

4.2.11. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais, induzido por bradicinina, capsaicina ou KCl

Em seguida, decidiu-se investigar se o pS100A9m seria capaz de interferir com a sinalização de outros agentes pró-nociceptivos, nos neurônios sensoriais. Assim, neurônios DRG foram estimulados com capsaicina (Figura 25A), bradicinina (Figura 25B) ou cloreto de potássio - KCl (Figura 26) e o efeito de diferentes concentrações do pS100A9m, sobre a mobilização de cálcio, foi avaliado. A mobilização de cálcio em neurônios DRG, estimulados com capsaicina, foi inibida pelo pS100A9m nas concentrações de 50 e 100 μ M (15% e 14 % respectivamente), mas não pelas concentrações de 0,5 ou 5 μ M (Figura 25A). Ainda, 50 μ M, mas não 5 μ M do pS100A9m, inibiu significativamente a mobilização de cálcio, induzida por bradicinina, nos neurônios sensoriais (10% de inibição; Figura 25B).

Quando as células foram estimuladas com KCl foi observada inibição do influxo de cálcio pelo pS100A9m em todas as concentrações avaliadas, com porcentagens que variaram de 15 à 30% (Figura 26).

4.2.12. Efeito da tapsigaragina ou do ionóforo de cálcio, sobre a inibição do influxo de cálcio induzida pelo pS100A9m, em neurônios DRG

Considerando-se que o pS100A9m inibiu o influxo de cálcio nos neurônios DRG, independente do estímulo utilizado, avaliou-se se este peptídeo seria capaz de interferir com os estoques intracelulares de cálcio destas células. Os neurônios foram tratados com tapsigaragina (250 nM), um composto que depleta os estoques de cálcio intracelular, 5 min antes de serem

estimulados com KCl (50 mM) ou KCl concomitante ao pS100A9m (50 μ M). Os resultados obtidos demonstraram que este tratamento não modificou o efeito do pS100A9m sobre estas células (Figura 27). Quando os neurônios foram estimulados com ionóforo de cálcio (2 μ M), um composto que induz o transporte de íons através da membrana plasmática, sem o envolvimento de canais, ou ionóforo de cálcio concomitante com 5, 50 ou 100 μ M do pS100A9m, o peptídeo perdeu sua atividade inibitória sobre o influxo de cálcio (Figura 28).

4.2.13. Efeito do pS100A9m sobre correntes de cálcio de alta voltagem, em neurônios DRG avaliados por eletrofisiologia

Para se confirmar os dados obtidos com o pS100A9m sobre a inibição cálcio, neurônios DRG foram submetidos a ensaio de eletrofisiologia. Após a obtenção de um pico normalizado de correntes nos neurônios DRG, estes foram então perfundidos com 50 µM de pS100A9m por um período de 2,5 minutos. O peptídeo foi capaz de inibir correntes de cálcio de alta voltagem em cerca de 35%. (Figura 29). Após a perfusão com o pS100A9m as células foram lavadas com tampão de gravação, sendo que não foi observada reversão do efeito induzido pelo pS100A9m.

4.2.14. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA 201 transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) do tipo N e do tipo L avaliadas por microscopia

Confirmado o efeito inibitório do pS100A9m sobre as correntes de cálcio em neurônios DRG, decidiu-se avaliar se o pS100A9m poderia inibir diretamente os canais de cálcio. Foram utilizadas células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo

N (subunidade Cav2.2 + β_{1b} + α_2 - δ_1) ou do tipo L (subunidade Cav1.2 + β_{1b} + α_2 - δ_1), as quais foram estimuladas com KCl (50 mM) e receberam pS100A9m na concentração de 25 μ M. Os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m inibiu o influxo de cálcio das células com canais do tipo N (Figura 30A), sem interferir com o influxo de cálcio nas células com canais do tipo L (Figura 30B).

4.2.15. Efeito do pS100A9m sobre correntes de cálcio de alta voltagem, em células HEK-tsA 201 transfectadas com VDCC do tipo N ou do tipo L e avaliadas por eletrofisiologia

Para se consolidar os dados obtidos com o pS100A9m sobre a inibição de correntes de cálcio em VDCC do tipo N, células HEK-tsA transfectadas foram submetidas a ensaio de eletrofisiologia. Mais uma vez, a atividade em células com VDCC do tipo N (subunidade Cav2.2 + $\beta_{1b} + \alpha_2$ - δ_1), mas não em células com VDCC do tipo L (subunidade Cav1.2 + $\beta_{1b} + \alpha_2$ - δ_1), foi inibida em cerca de 40% pelo tratamento com 25 μ M do pS100A9m (Figura 31). Neste caso, a inibição induzida pelo pS100A9m foi parcialmente revertida quando as células foram reperfundidas com tampão de gravação (Figura 32). A superposição das densidades de corrente (relação corrente/voltagem) na ausência (controle) ou presença de 25 μ M de pS100A9m, demonstrou que a voltagem de ativação das células não foi afetada pelo tratamento com o peptídeo (Figura 33).



Figura 11. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl. nas concentrações de 1µg (\blacksquare), 4µg (\square) ou 8µg (\blacksquare) concomitante à injeção intraplantar de 10µg de PAR₂AP (volume final de 100 µL). Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após os tratamentos. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 12. Efeito do pré-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl.(volume de 50 µL) nas concentrações de 1µg (\blacksquare), 4µg (\Box) ou 8µg (\blacksquare) 30 min antes da injeção i.pl. de 10µg/ 50 µL de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de PAR₂AP. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 13. Efeito do pós-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl.(volume de 50 µL) nas concentrações de 1µg (\blacksquare) ou 4µg (\Box), 1 h após a injeção i.pl. de 10µg/ 50 µL de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2 e 3 h após a injeção de pS00A9m. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial



Figura 14. Efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl. nas concentrações de 0,1µg (\blacksquare), 1µg (\square) ou 20µg (\blacksquare) concomitante à injeção intraplantar de 10µg de PAR₂AP (volume final de 100 µL). Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após os tratamentos. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (##) p<0,01 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 15. Efeito do pré-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl.(volume de 50 µL) nas concentrações de 0,1µg (\blacksquare), 1µg (\Box) ou 20µg (\blacksquare), 30 min antes da injeção i.pl. de 10µg/ 50 µL de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de PAR₂AP. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (*) p<0,05 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 16. Efeito do pós-tratamento do pS100A9m sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo PAR₂AP. O pS100A9m foi administrado i.pl. (volume de 50 µL) nas concentrações de 1µg (\blacksquare) ou 20µg (\Box), 1 h após a injeção i.pl. de 10µg/ 50 µL de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2 e 3 h após a injeção de pS100A9m. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo.





Figura 17. Efeito da salina, pS100A9m, PAR₂AP, ou PAR₂AP concomitante ao pS100A9m na expressão de Egr-1 no corno dorsal da medula espinhal de ratos. **A-E:** Fotomicrografias de secções de corno dorsal de medula espinhal submetida à imuno-histoquímica de (**A**) animais normais (controle), (**B**) após a injeção i.pl. de salina; (**C**) 4µg i.pl. de pS100A9m; (**D**) 10µg i.pl. de PAR₂AP; (**E**) tratamento concomitante com PAR₂AP e pS100A9m. A figura **F** representa as alterações quantitativas na imunoreatividade para Egr-1 no corno dorsal (L4 e L5) de ratos. As medulas espinhais foram coletadas após 3 h dos tratamentos. Escala (-) = 50 µm. Dados representam a media ± e.p.m. de 6 animais por grupo. (**) p<0,01 em relação ao grupo controle.



Figura 18 – Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com tripsina. Os neurônios foram expostos à tripsina (5U) concomitante ao pS100A9m (0,5; 5; 50 ou 100 μ M). Neurônios expostos somente à tripsina foram considerados como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (**) p<0,01 em comparação com o grupo controle.



Figura 19 – Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com PAR₂AP. Os neurônios foram expostos ao PAR₂AP (100 μ M), concomitante ao pS100A9m (0,5; 5; 50 ou 100 μ M). Neurônios expostos somente ao PAR₂AP foram considerados como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,05). (**) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,01).



Figura 20 – Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células HEK-293 estimuladas com tripsina. (**A**) As células foram ativadas pela exposição com 5U de tripsina (**•**) ou tripsina concomitante a 50 μ M de pS100A9m (**•**). (**B**) As células foram incubadas com salina por 10 min (**•**) ou com 50 μ M de pS100A9m (**•**) previamente à exposição com tripsina (5U). (**C**) Quantificação da magnitude de cálcio em células HEK-293 expostas à tripsina ou pS100A9m. As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular, foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células HEK-293.



Figura 21. Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células HEK-293 estimuladas com PAR₂AP. (**A**) As células foram ativadas pela exposição com 50 μ M de PAR₂AP (**•**) ou PAR₂AP concomitante à 50 μ M de pS100A9p (**A**). (**B**) As células foram incubadas por 10 min com salina (•) ou 50 μ M de pS100A9m (•) previamente à exposição com 50 μ M de PAR₂AP. (**C**) Quantificação da magnitude de cálcio em células HEK-293 expostas ao PAR₂AP ou pS100A9m. As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular, foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células HEK-293.



Figura 22. Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células KNRK-PAR₂ estimuladas com tripsina. (**A**) As células foram ativadas pela exposição com 1U de tripsina (**•**) ou tripsina concomitante a 50 μ M de pS100A9m (**•**). (**B**) As células foram incubadas com salina por 10 min (•) ou com 50 μ M de pS100A9m (•) previamente à exposição com 1U de tripsina. (**C**) Quantificação da magnitude de cálcio em células KNRK-PAR₂ expostas à tripsina ou pS100A9m. As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular, foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células KNRK-PAR₂.



Figura 23. Efeito do pS100A9m sobre a sinalização de cálcio em células KNRK-PAR₂ estimuladas com PAR₂AP. (A) As células foram ativadas pela exposição com 5 μ M de PAR₂AP (\bullet) ou PAR₂AP concomitante à 50 μ M de pS100A9p (\blacklozenge). (B) As células foram incubadas por 10 min com salina (\bullet) ou 50 μ M de pS100A9m (\blacklozenge) previamente à exposição com 5 μ M de PAR₂AP. (C) Quantificação da magnitude de cálcio em células KNRK-PAR₂ expostas ao PAR₂AP ou pS100A9m. As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular, foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células KNRK-PAR₂.



Figura 24. Efeito do pS100A9m sobre a liberação de substância P (SP) em culturas de neurônios DRG avaliadas por ELISA. As células foram estimuladas pelo tratamento agudo com veículo, LRGILS-NH₂ (100 mM; peptídeo reverso, controle do PAR₂AP), PAR₂AP (100 mM), pS100A9m (50 μ M) ou PAR₂AP concomitante ao pS100A9m. Os dados representam a média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (**) p<0,01 em relação ao veículo ou LRGILS-NH₂ e (#) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 25. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com capsaicina ou bradicinina. Os neurônios foram expostos à capsaicina (100 nM; **A**) ou bradicinina (10 nM; **B**) concomitante ao pS100A9m (0,5; 5; 50 ou 100 μ M). Neurônios expostos somente à capsaicina ou bradicinina foram considerados como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais, por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*) p<0,05 em relação ao grupo controle e (**) p<0,01 em relação ao grupo controle.



Figura 26. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com KCl. Os neurônios foram expostos ao KCl (50 mM) concomitante ao pS100A9m (0,5; 5; 50 ou 100 μ M). Neurônios expostos somente ao KCl foram considerados como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais, por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*) p<0,05 em relação ao grupo controle e (***) p<0,001 em relação ao grupo controle.


Figura 27. Efeito da tapsigaragina no efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG. Os neurônios foram pré-incubados por 5 min com tapsigaragina (250 nM) e após este período foram expostos ao KCl (50 mM) concomitante ao pS100A9m (50 μ M). Neurônios expostos somente ao KCl foram considerados como grupo controle. Neurônios tratados apenas com KCl e tapsigaragina também foram avaliados. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais, por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média \pm e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*) p<0,05 em relação ao grupo controle e (#) p<0,05 em relação ao tratado com KCl + tapsigaragina.



Figura 28. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com ionóforo de cálcio. Os neurônios foram estimulados com ionóforo de cálcio (IC; 2 μ M) concomitante ao pS100A9m (0,5; 50 ou 100 μ M). Neurônios expostos somente ao IC foram considerados como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais, por fluorescência, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo.



Figura 29. Efeito do pS100A9m sobre correntes nativas de cálcio em neurônios DRG avaliados por eletrofisiologia. As células foram constantemente perfundidos com solução de gravação sendo o pS100A9m (50 μ M) adicionado após a normalização da corrente, por um período de 2,5 min. As correntes de cálcio foram gravadas durante um pulso de teste de 0 a + 10 mV (150 ms) a partir de um potencial de repouso de -60 mV. As medidas de correntes de cálcio foram realizadas, em células individuais, utilizando-se amplificador Axopatch 200B. Os dados representam à média ± e.p.m. de 8-10 células. (*) p<0,05 em relação ao pico de corrente no tempo 0.



Figura 30. Efeito do pS100A9m sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N (subunidade Cav2.2 subunit - + β_{1b} , α_2 - δ_1) (**A**) ou do tipo L (subunidade Cav1.2 - + β_{1b} , α_2 - δ_1) (**B**). As células foram expostas ao KCl (50 mM) concomitante ao pS100A9m (0,1; 0,5; 1; 5; 50 ou 100 μ M). Células expostas somente ao KCl foram consideradas como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido em célula sinduviduais, por fluorescência a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam a média ± e.p.m. de 15-20 células por grupo. (*) p<0,05 em relação ao grupo controle, (**) p<0,01 em relação ao grupo controle e (***)p<0,001 em relação ao grupo controle.



Figura 31. Efeito do pS100A9m sobre correntes de cálcio em células HEK-tsA-201 transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N e avaliadas por eletrofisiologia. Medida das correntes nativas de cálcio (C) mostrando inibição de correntes tipo N na presença de 25 μ M de pS100A9m. O histograma mostra o bloqueio das correntes do tipo N expressas pela subunidade Cav2.2 em células tsA-201 (C/C controle = 0,59 ± 0,03 para Cav2.2 e C/C controle = 0,94 ± 0,02 para Cav1.2). A amplitude de corrente foi elicitada por um pulso teste de +10 mV (150 ms) a partir de potencial de repouso de -90 mV. O pS100A9m foi perfundido nas células por um período de 2,5 minutos e após este período as células foram perfundidas com solução de gravação. As medidas de correntes de cálcio foram realizadas, em células individuais, utilizando-se amplificador Axopatch 200B. Os dados representam à média ± e.p.m. de 8-10 células. (***) p<0,001 em relação ao controle (sem tratamento – perfundido com tampão de gravação).



Figura 32. Curva tempo/efeito do bloqueio de amplitude de corrente de cálcio via canais do tipo N, pelo pS100A9m em células tsA-201. A amplitude de corrente foi elicitada por um pulso teste de +10 mV (150 ms) a partir de potencial de repouso de -90 mV. O pS100A9m (25 μ M) foi perfundido nas células por um período de 2,5 minutos e após este período as células foram perfundidas com solução de gravação. As medidas de correntes de cálcio foram realizadas, em células individuais, utilizando-se amplificador Axopatch 200B. Os dados representam à média ± e.p.m. de 8-10 células. (*) p<0,05 em relação ao pico de corrente no tempo 0.



Figura 33. Curva de densidade de corrente normalizada (corrente/voltagem) de células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N, na ausência (controle) ou presença de 25 μ M. As medidas de correntes de cálcio foram realizadas, em células individuais, utilizando-se amplificador Axopatch 200B.

4.3. Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo AcE⁹⁷-G¹⁰² – Ação sobre PAR₂

4.3.1. Efeito do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP

Ratos foram injetados pela via intraplantar (i.pl.) com PAR₂AP, na concentração de 10 μ g/100 μ L, concomitante a 10 μ M de AcE⁹⁷-G¹⁰². O limiar nociceptivo em resposta ao estímulo mecânico foi medido antes e após diferentes tempos do tratamento com os peptídeos. O AcE⁹⁷-G¹⁰² inibiu a hiperalgesia induzida por PAR₂AP em todos os tempos avaliados, com porcentagem de inibição em torno de 50%. (Figura 34).

O pré-tratamento (30-min antes) com o AcE^{97} - G^{102} , também reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP, em todos os tempos avaliados, porém com maior magnitude do que o observado para o pS100A9m (Figura 35).

4.3.2. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR_2AP

De maneira similar ao resultado obtido na hiperalgesia mecânica, a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP também foi significativamente revertida pela administração i.pl., concomitante de 10 μ M de AcE⁹⁷-G¹⁰². Contudo, neste modelo, o peptídeo reverteu a hiperalgesia apenas na primeira hora de avaliação (Figura 36). Por outro lado, o pré-tratamento com o AcE⁹⁷-G¹⁰², 30 min antes do PAR₂AP, foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica em todos os tempos avaliados (Figura 37).

4.3.3. Efeito do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais

O efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG também foi avaliado. Neurônios DRG foram estimulados com: tripsina (5 U, Figura 38A) ou PAR₂AP (100 μ M, Figura 38B), concomitante ao AcE^{97} - G^{102} , na concentração de 10 μ M. Em ambos os casos foi observada inibição do influxo de cálcio nos neurônios DRG com porcentagens que variaram de 5 a 15% (Figura 38 A e B).

4.3.4. Efeito do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre o influxo de cálcio em células HEK-293 e células KNRK-PAR₂

Uma vez observada inibição do influxo de cálcio nos neurônios DRG frente à ativação de PAR₂, avaliou-se o efeito do $AcE^{97}-G^{102}$ sobre a sinalização de cálcio de células HEK-293 ou KNRK-PAR₂. Da mesma forma que o observado com o pS100A9m, o tratamento concomitante com 10 µM de $AcE^{97}-G^{102}$, não interferiu com o influxo de cálcio induzido tanto por tripsina (5 U; Figura 39A), quanto pelo peptídeo agonista de PAR₂ (Figura 39B). Ainda, o influxo de cálcio induzido por tripsina (1 U) ou PAR₂AP (5 µM) também não foi modificado pelo tratamento concomitante com o $AcE^{97}-G^{102}$ em células KNRK-PAR₂ (Figura 40A e B).

4.3.5. Efeito do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre o influxo de cálcio em neurônios sensoriais induzido por bradicinina, capsaicina ou KCl

Uma vez que o AcE⁹⁷-G¹⁰² não interferiu com o influxo de cálcio em células HEK-293 ou KNRK-PAR₂, avaliou-se a capacidade deste peptídeo, assim como o determinado com o

pS100A9m, em interferir com o influxo de cálcio em neurônios DRG, estimulados com outros agentes pró-nociceptivos. Os resultados obtidos demonstraram que similar ao observado com o pS100A9m, o AcE^{97} - G^{102} (10 µM) inibiu o influxo de cálcio nos neurônios estimulados por bradicinina ou KCl (Figura 41 A e B). No entanto, nenhum efeito foi observado quando as células foram estimuladas com capsaicina (Figura 41 C).

4.3.6. Efeito do AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA 201 transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) do tipo N e do tipo L

O efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA transfectadas com VDCC do tipo N ou tipo L também foi avaliado. As células foram estimuladas pelo tratamento agudo com KCl (50 mM) ou KCl concomitante ao AcE^{97} - G^{102} . De maneira semelhante ao demonstrado para o pS100A9m, este peptídeo induziu reversão do influxo de cálcio apenas nas células transfectadas com VDCC do tipo N (Figura 42).



Figura 34. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP. O AcE^{97} - G^{102} foi administrado, na concentração de 10 µM, concomitante à injeção intraplantar de 10µg de PAR₂AP (volume final de 100 µL). Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após os tratamentos. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 35. Efeito do pré-tratamento com o AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PAR₂AP. O AcE^{97} - G^{102} foi administrado i.pl. (50 µL) na concentração de 10 µM, 30 min antes da injeção i.pl. de $10\mu g/50 \mu L$ de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de PAR₂AP. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP; (***) p<0,001 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 36. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP. O AcE^{97} - G^{102} foi administrado, na concentração de 10 µM, concomitante à injeção intraplantar de 10µg de PAR₂AP (volume final de 100 µL). Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após os tratamentos. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média ± e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 37. Efeito do pré-tratamento com o AcE⁹⁷-G¹⁰² sobre a hiperalgesia térmica induzida por PAR₂AP. O AcE⁹⁷-G¹⁰² foi administrado i.pl. (50 µL) na concentração de 10 µM 30 min antes da injeção i.pl. de 10µg/ 50 µL de PAR₂AP. Os animais foram avaliados antes (tempo 0), 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de PAR₂AP. Animais tratados apenas com PAR₂AP foram submetidos ao mesmo protocolo experimental e avaliados como grupo controle. Os dados correspondem à média \pm e.p.m de 5 a 6 animais por grupo. (#) p<0,05 em relação à medida inicial, (**) p<0,01 em relação ao grupo tratado apenas com PAR₂AP.



Figura 38. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com tripsina ou PAR₂AP. Os neurônios foram expostos à tripsina (5U; **A**) ou PAR₂AP (100 µM; **B**), concomitante a 10 µM de AcE^{97} - G^{102} . Neurônios expostos somente à tripsina ou PAR₂AP foram considerados como grupos controles. O influxo de cálcio foi medido, por fluorescência, em células individuais, a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*****) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,05). (******) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,05). (******)



Figura 39. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a sinalização de cálcio em células HEK-293. Em (**A**) As células foram ativadas pela exposição com 5U de tripsina ou tripsina concomitante a 10 µM de AcE^{97} - G^{102} . Em (**B**) As células foram ativadas pela exposição com 50µM de PAR₂AP ou PAR₂AP concomitante à 10 µM de AcE^{97} - G^{102} . As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células HEK-293.



Figura 40. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre a sinalização de cálcio em células KNRK-PAR₂. Em (**A**) As células foram ativadas pela exposição com 1U de tripsina ou tripsina concomitante a 10 μ M de AcE^{97} - G^{102} . Em (**B**). As células foram ativadas pela exposição com 5 μ M de PAR₂AP ou PAR₂AP concomitante à 10 μ M de AcE^{97} - G^{102} . As medidas de fluorescência, refletindo elevações de cálcio intracelular, foram realizadas à 24°C, utilizando-se espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm. Os dados são ilustrativos para 4 ou mais experimentos, conduzidos em duas ou mais culturas distintas de células KNRK-PAR₂.



Figura 41. Efeito do AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em neurônios DRG. Os neurônios foram estimulados pelo tratamento agudo com bradicinina (10 nM; **A**), KCl (50 nM; **B**) ou capsaicina (100 nM; **C**) concomitantes ou não com a 10 µM do AcE^{97} - G^{102} . No caso da capsaicina foi usada também a concentração de 50 µM do AcE^{97} - G^{102} . Neurônios expostos somente à bradicinina, KCl ou capsaicina foram considerados como grupos controle. O influxo de cálcio foi medido, em células individuais, por fluorescência a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 neurônios por grupo. (*) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,05). (**) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,01).



Figura 42. Efeito AcE^{97} - G^{102} sobre o influxo de cálcio em células HEK-tsA transfecatdas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N (**A**) ou do tipo L (**B**). As células foram expostas ao KCl (50 mM) concomitante ao AcE^{97} - G^{102} (10 μ M). Células expostas somente ao KCl foram consideradas como grupo controle. O influxo de cálcio foi medido em células individuais, por fluorescência a excitações de 460-490 nm e emissões de 515 nm, utilizando-se Microscópio de Fluorescência Wide-Field. Foi realizada uma cinética de 30 fotografias em 90 segundos. Os dados representam à média ± e.p.m. de 15-20 células por grupo. (*) diferença significativa em comparação com o grupo controle (p<0,05)

Díscussão

5. DISCUSSÃO

A propriedade antinociceptiva da proteína ligante de cálcio S100A9 murina, foi demonstrada em modelos experimentais de avaliação de sensibilidade dolorosa, onde esta proteína é capaz de inibir a nocicepção inflamatória (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2002; PAGANO et al., 2006). Foi também demonstrado que o peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 (pS100A9m) induz antinocicepção, em animais submetidos a diferentes modelos de nocicepção e hiperalgesia experimental (DALE et al., 2004; DALE et al., 2006a/b; PACOLLA et al., 2004) e, que este peptídeo, inibe o espraiamento e atividade fagocítica de células peritoneais aderentes (PAGANO et al., 2005). Dados obtidos por nosso grupo demonstraram que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida por tripsina, uma serinoprotease capaz de ativar receptores ativados por protease do tipo 2 (DALE CS, 2002; DALE et al., 2006b).

Considerando-se os efeitos da proteína S100A9, bem como do pS100A9m, sobre a nocicepção experimental, neste trabalho foi avaliada, inicialmente, a relação estrutura/efeito do pS100A9m, a fim de determinar a menor seqüência peptídica responsável pela atividade antinociceptiva. Ainda, uma vez que serinoproteases por uma ação em receptores ativados por protease (PARs) possuem papel primordial na transmissão dolorosa (VERGNOLLE et al., 2001b, HOOGERWERF et al., 2001; VERGNOLLE et al., 2003, revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT 2004) e, que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida por tripsina (DALE C.S., 2002; DALE et al., 2006b), serinoprotease capaz de ativar PAR₂ (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT 2004; revisto por BUNNET, 2006), neste trabalho, foram também investigados os efeitos do pS100A9m e da menor seqüência ativa sobre a hiperalgesia induzida por um peptídeo agonista seletivo de PAR₂, bem como os mecanismos envolvidos neste efeito.

Para o estudo da relação estrutura/efeito do pS100A9m, foram sintetizadas diferentes seqüências peptídicas homólogas ao pS100A9m, diferindo apenas na quantidade de aminoácidos, as quais foram avaliadas em ratos submetidos ao modelo de pressão de pata (Analgesy-meter, Ugo Basile®, Itália). O modelo de pressão de pata de ratos utiliza o estímulo mecânico como agente lesivo. Este estímulo ativa diretamente os nociceptores de fibras C e A δ induzindo uma resposta motora dos animais, traduzida pela reação de retirada da pata (RANDALL & SELITTO, 1957). Este modelo é amplamente empregado para o estudo de drogas analgésicas com atividade periférica, uma vez que pode ser associado à hiperalgesia inflamatória, caracterizada pelo aumento na sensibilidade dolorosa pela ação de mediadores químicos sobre os nociceptores, diminuindo o limiar de ativação em resposta a um segundo estímulo (FERREIRA, 1990; DRAY & BEVAN, 1993; DRAY, 1997; LEVINE & REICHLING, 1999). Neste trabalho, para a avaliação do efeito dos peptídeos homólogos foi empregado o modelo de hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina, a qual foi representada pela diminuição no limiar de resposta dos animais ao teste de pressão de pata. A escolha deste modelo ocorreu uma vez que dados anteriores demonstraram que o pS100A9m inibe a hiperalgesia induzida pela carragenina em ratos submetidos ao teste de pressão de pata, sendo sua concentração efetiva, neste teste, de 5 µM/ animal (DALE et al., 2006a).

Foram sintetizados e avaliados 15 peptídeos homólogos ao pS100A9m, considerando-se os aminoácidos presentes no domínio C-terminal da proteína S100A9 (HESSIAN et al., 1993; RAFTERY et al., 1996). Cada peptídeo foi denominado pelo aminoácido inicial e final presente em sua seqüência. Inicialmente, foram sintetizados peptídeos denominados H⁹⁶-P¹⁰⁰, P¹⁰⁰-G¹¹⁰ e H¹⁰⁷-G¹¹⁰. A análise dos resultados demonstrou que estas seqüências peptídicas, embora tenham apresentado efeito inibitório na hiperalgesia induzida pela carragenina, demandaram o uso de

concentrações efetivas potencialmente mais altas, se comparado com a concentração empregada do pS100A9m capaz de induzir antinocicepção neste modelo. Dessa forma, optou-se por sintetizar seqüências peptídicas correspondentes à região N-terminal do pS100A9m, as quais foram denominadas H⁹²-S¹⁰⁶ e H⁹²-G¹⁰². Os resultados obtidos com estas seqüências demonstraram que o H⁹²-G¹⁰² apresentou efeito inibitório no modelo aqui utilizado, sendo sua concentração efetiva, neste modelo (7,5 µM), semelhante àquela observada com o pS100A9m. Esta seqüência foi utilizada como referência para as sínteses subseqüentes, originando então os peptídeos denominados H⁹²-E⁹⁷ e E⁹⁷-G¹⁰². O E⁹⁷-G¹⁰² foi o que apresentou melhor atividade inibitória, comparando-se com o pS100A9m empregado em nossos experimentos, uma vez que foi efetivo na concentração de 15 µM. Cabe ressaltar, que outros estudos realizados em nosso laboratório, com as seqüências peptídicas do C-terminal da S100A9 murina, em ensaios de atividade celular, demonstraram que ao contrário do observado na avaliação da sensibilidade dolorosa, o peptídeo H^{92} - E^{97} , o qual inibe a hiperalgesia induzida pela hiperalgesia apenas na concentração de 100 μ M), inibe as atividades de espraiamento e fagocitose de células peritoneais aderentes, efeito este que não foi detectado com a seqüência E⁹⁷-G¹⁰² (PAGANO et al., 2005). Ainda, foi observado que apenas o H^{92} - E^{97} é capaz de aumentar a atividade fungicida de levedura de Candida albicans, via ânion superóxido e óxido nítrico, bem como inibe a atividade fagocítica aumentada induzida por agonistas de PAR₁ (PAGANO RL, 2005). As atividades demonstradas com os peptídeos menores sintetizados a partir do pS100A9m sugerem que diferentes porções desta região da molécula da proteína S100A9m atuam de maneira distinta sobre a fisiopatologia da resposta inflamatória e nociceptiva.

Dando sequência à síntese dos peptídeos a partir do $E^{97}-G^{102}$, foram sintetizados os seguintes peptídeos: $H^{96}-R^{101}$, $H^{96}-P^{100}$, $H^{96}-G^{102}$, $E^{97}-P^{100}$ e $E^{97}-R^{101}$. Os resultados obtidos,

sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina, demonstraram que o E^{97} -R¹⁰¹ possui melhor atividade antinociceptiva quando comparado com os outros peptídeos avaliados. O passo seguinte foi sintetizar este peptídeo com o domínio carboxi-terminal livre (E^{97} -R¹⁰¹COO⁻), fato este que diminuiu seu efeito inibitório, fazendo com que o mesmo fosse descartado para avaliações posteriores. Desta forma, decidiu-se avaliar a influência da acetilação da região Nterminal dos peptídeos com maior atividade inibitória. Para tanto, foram sintetizados o AcH⁹⁶-P¹⁰⁰ e o AcE⁹⁷-G¹⁰², sendo que os resultados obtidos demonstraram que o AcE⁹⁷-G¹⁰² inibiu a hiperalgesia induzida pela carragenina, com potência similar ao observado com o pS100A9m, na concentração de 10 μ M. Em conjunto, estes dados demonstraram que dentre os aminoácidos presentes na porção C-terminal da proteína S100A9 murina, a região E⁹⁷-G¹⁰² é a que está mais envolvida com a atividade antinociceptiva observada. Diante disto, o peptídeo AcE⁹⁷-G¹⁰² foi empregado, comparativamente ao pS100A9m, na avaliação dos mecanismos envolvidos na inibição da hiperalgesia induzida pela ativação de PAR₂.

Durante a resposta inflamatória, uma série de fenômenos são mediados por sistemas enzimáticos. As enzimas liberadas no foco inflamatório atuam em diferentes processos tais como, aumento de permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização e neutralização de agentes injuriantes, dentre outros (COTRAN et al., 1999). A liberação de enzimas proteolíticas, bem como seus inibidores, durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória é um fenômeno importante para a resolução do processo (COTRAN et al., 1999). A participação de proteases na gênese da resposta nociceptiva, bem como no desenvolvimento da hiperalgesia, tem sido enfocada pela ação de serinoproteases sobre os Receptores Ativados por Proteases (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004). Estudos recentes realizados com estes receptores têm levantado novas hipóteses, não apenas sobre a participação das serinoproteases no

desencadeamento do fenômeno de dor, mas também sobre o potencial fisiológico e funcional de algumas enzimas como reguladoras de funções celulares, sendo que proteases como trombina, tripsina e triptase podem regular células alvo pela clivagem e ativação dos PARs (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004).

Uma vez que os PARs possuem papel fundamental no desencadeamento da nocicepção e, que o pS100A9m é capaz de inibir a hiperalgesia induzida por tripsina (DALE CS, 2002; DALE et al., 2006b), principal enzima ativadora de PAR₂ (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004; revisto por BUNNET, 2006), na etapa seguinte deste trabalho foi investigado o efeito do pS100A9m e da menor seqüência ativa ($AcE^{97}-G^{102}$) sobre a hiperalgesia induzida por um peptídeo agonista seletivo de PAR₂, bem como os mecanismos envolvidos neste efeito.

Os resultados aqui apresentados, demonstraram que o peptídeo agonista de PAR₂ (PAR₂AP; 10 µg) induziu hiperalgesia em ratos avaliados no modelo de pressão de pata, por um período de pelo menos 4 horas, sem induzir a formação de edema podal. Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que a injeção intraplantar de 10µg PAR₂AP induz hiperalgesia, em modelo de dor experimental, sem a presença de edema, vasodilatação, aumento na liberação de prostaglandina ou infiltração granulocítica, sugerindo o envolvimento destes receptores no desencadeamento da resposta nociceptiva com ausência de inflamação (VERGNOLLE et al. 2001a). O PAR₂AP possui a seqüência idêntica àquela gerada após a catálise enzimática do N-terminal do receptor PAR₂ (SLIGRL-NH₂). Esse tipo de peptídeo tem sido empregado como uma ferramenta para o estudo de PARs, uma vez que ativa diretamente o receptor sem causar clivagem, sendo os efeitos subseqüentes observados decorrentes exclusivamente da ativação do PAR, podendo ser descartados outras atividades mediadas pela ação da enzima ativadora sobre a homeostasia normal (revisto por OSSOVSKAYA & BUNNETT, 2004).

O pS100A9m, em todas as concentrações testadas, inibiu tanto a hiperalgesia mecânica quanto térmica induzidas pelo PAR₂AP, quando injetado 30 minutos antes ou concomitante ao agonista. No modelo de hiperalgesia mecânica, o tratamento concomitante induziu uma inibição que variou de 50 a 80%, para as diferentes concentrações de pS100A9m, sendo que as concentrações mais altas acarretaram inibição até a terceira hora de avaliação. Quando o pS100A9m foi injetado 30 min antes do PAR₂AP, a inibição da hiperalgesia mecânica chegou a 100% para a maior concentraçõe avaliada.

O efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia térmica foi muito semelhante ao observado para a hiperalgesia mecânica, sendo que neste modelo a inibição observada para as duas primeiras horas de avaliação chegou a 100%. Ainda, cabe ressaltar que na primeira hora após o tratamento concomitante com o pS100A9m foi observado, além da reversão da hiperalgesia, um aumento no limiar de resposta dos animais. Já, o tratamento prévio com o pS100A9m, induziu inibição da hiperalgesia apenas na primeira hora de avaliação e com as concentrações mais altas do peptídeo. Com relação ao efeito do pS100A9m sobre a hiperalgesia em curso, tanto mecânica quanto térmica, não foi observada alteração do limiar nociceptivo quando o pS100A9m foi injetado 1 hora após o PAR₂AP, indicando que após a ativação do PAR₂ o pS100A9m perde a capacidade de inibir a hiperalgesia observada. Este dado sugere que o pS100A9m poderia agir, possivelmente, na inibição da ativação de PAR₂, por um mecanismo competitivo pelo receptor. Uma vez que a literatura descreve que a concentração de PAR₂AP aqui utilizada (10 µg por pata de rato) não é capaz de induzir sinais inflamatórios (VERGNOLLE et al. 2001b), é plausível sugerir que a atividade antinociceptiva do pS100A9m não está relacionada com um possível efeito antiinflamatório deste peptídeo (PAGANO et al., 2005), mas sim por uma ação direta do pS100A9m sobre as vias de transmissão de mensagens nociceptivas após a ativação de PAR₂.

Para avaliar o efeito do pS100A9m sobre a ativação de neurônios medulares após a indução da hiperalgesia pelo PAR₂AP, foi realizado ensaio de imuno-histoquímica para expressão da proteína Egr-1. Os resultados aqui obtidos demonstraram que a injeção i.pl. de PAR₂AP foi capaz de induzir um aumento significativo da expressão de Egr-1 (56%), 3 horas após a injeção do peptídeo agonista, apenas no lado ipsolateral à sua administração. Estes dados corroboram com resultados que demonstram que a injeção intraplantar de PAR₂AP induz aumento significativo na expressão de Fos, 2 horas após a injeção do peptídeo agonista, apenas no lado ipsolateral ao tratamento (VERGNOLLE et al., 2001b). A literatura demonstra que a expressão de proto-oncogenes, como c-fos, c-jun, jun-D e egr-1, entre outros, no encéfalo e medula espinhal é afetada pela estimulação nociceptiva, demonstrando uma relação estímuloresposta que o proto-oncogene egr-1 e seu produto de transcrição, a proteína Egr-1, são expressos em diferentes áreas do encéfalo e medula espinhal de ratos, após estimulação nociceptiva periférica (HERDEGEN et al., 1991; BURITOVA et al., 1995). Assim, foi demonstrado o aumento na expressão de Egr-1 no corno dorsal da medula espinhal de ratos, tanto após injeção intraplantar de carragenina (BURITOVA et al., 1995) quanto, após estimulação elétrica nociceptiva no nervo ciático (HERDEGEN et al., 1991). Em ambos os casos, o aumento na expressão de Egr-1 foi observado do mesmo lado em que o estímulo nociceptivo foi aplicado. Uma vez confirmada a capacidade do PAR₂AP em ativar neurônios espinhais nociceptivos, foi investigada a influência do pS100A9m sobre este efeito. Os resultados demonstraram que o tratamento concomitante do pS100A9m com o PAR₂AP reverteu o aumento na expressão de Egr-1, que retornou aos níveis basais, sugerindo que o pS100A9m interfere com a transmissão das mensagens nociceptivas ao sistema nervoso central após a ativação de PAR₂.

Considerando os dados descritos acima, que sugerem uma atividade inibitória do pS100A9m após a ativação de PAR₂ por uma ação central, avaliou-se o efeito deste peptídeo sobre a ativação de neurônios sensoriais. Os resultados aqui apresentados demonstraram que o pS100A9m é capaz de agir diretamente na ativação do neurônio sensorial, uma vez que este peptídeo inibiu a mobilização de cálcio em neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (DRG), quando estas células foram estimuladas com tripsina ou PAR₂AP. Assim, estes dados mostram os neurônios sensoriais como outro alvo celular importante para os efeitos da proteína S100A9. Considerando-se que proteases são amplamente liberadas em sítios inflamatórios e são capazes de sinalizar diretamente para neurônios sensoriais, pela ativação de PAR₂, causando sensibilização e consequentemente sinais dolorosos (KIRKUP et al., 2003; HOOGERWERF et al., 2001; VERGNOLLE et al., 2001b; REED et al.; 2003), seria possível inferir uma ação do pS100A9m como um antagonista de PAR₂, reduzindo a transmissão do sinal nociceptivo. Esta hipótese foi testada investigando-se os efeitos do pS100A9m em células, que expressam PAR₂, distintas de neurônios sensoriais.

Os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m na concentração de 50 µM, a qual demonstrou efeito máximo nos neurônios DRG frente à agonistas de PAR₂, não modificou a amplitude da resposta do cálcio em células HEK-293, que naturalmente expressam PAR₂, ou em células KNRK, transfectadas com o receptor PAR₂, frente ao estímulo com tripsina ou PAR₂AP. Este resultado sugere que o pS100A9m não atua como um antagonista específico de PAR₂, uma vez que ele não é capaz de inibir a ativação de PAR2 em diferentes tipos celulares. Uma explicação plausível para este fato é que as vias de sinalização envolvidas na mobilização de cálcio sejam distintas em neurônios DRG e células HEK-293 ou KNRK- transfectadas. Ou ainda, que o pS100A9m possa agir nas vias de sinalização e mobilização de cálcio, em neurônios sensoriais, subseqüentes à ativação do PAR₂.

Com a finalidade de se esclarecer o mecanismo envolvido no efeito inibitório do pS100A9m, inicialmente foi avaliada a atividade deste peptídeo sobre a liberação de substância P, induzida por PAR₂ em neurônios sensoriais. Neste modelo, o pS100A9m apresentou efeito inibitório sobre a liberação deste neurotransmissor. Considerando o papel chave desempenhado pela substância P na transmissão da mensagem nociceptiva (revisto por HARRISON & GEPPETTI, 2001), os resultados aqui obtidos sugerem que a propriedade antinociceptiva do pS100A9m possa ocorrer por uma inibição da liberação de substância P, inibindo posteriormente a ativação de vias nociceptivas.

Dando seqüência, avaliou-se a capacidade do pS100A9m em inibir a sinalização em neurônios sensoriais induzidas por outros agentes pró-nociceptivos. Os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m inibiu o influxo de cálcio em neurônios DRG estimulados com capsaicina, bradicinina ou KCl, sendo que quando as células foram estimuladas com capsaicina, diferente do observado para tripsina e PAR₂AP, o pS100A9m inibiu o influxo de cálcio apenas nas concentrações mais altas (50 e 100 μ M). O fato do pS100A9m inibir a mobilização de cálcio em neurônios sensoriais, independente do estímulo utilizado, sugere que este peptídeo atue como um inibidor comum a estes ativadores de neurônios sensoriais. Uma vez que o pS100A9m possui a capacidade de inibir a mobilização de cálcio em resposta à ativação de três receptores distintos: receptor B2 de bradicinina; receptores vanilóides de potencial transitório- 1 (TRPV1 - transient receptor potential vanilloid -1, ativados por capsaicina em neurônios DRG); ou PAR₂, foi levantada a hipótese de que o pS100A9m pudesse bloquear diretamente o cálcio nos neurônios sensoriais, os quais são comuns às vias de sinalização destes três receptores.

Neste sentido, avaliou-se o efeito do pS100A9m sobre os estoques de cálcio intracelular nos neurônios sensoriais estimulados com KCl. Os resultados obtidos demonstraram que o prétratamento das células com tapsigaragina, um inibidor específico de cálcio que promove a descarga deste íon dos estoques intracelulares (THASTRUP et al., 1990), não interferiu com o efeito inibitório induzido pelo pS100A9m, indicando que o alvo deste peptídeo fosse o cálcio extracelular. Ainda, os resultados que demonstraram que o pS100A9m não interfere com o influxo de cálcio nos neurônios estimulados com ionóforo de cálcio, um composto que transfere seletivamente cálcio e outros cátions divalentes pelas de membranas plasmáticas (LUCKASEN et al., 1974), reforçam a hipótese de que o pS100A9m atue diretamente nos canais de cálcio presentes nos neurônios DRG.

Para se confirmar os dados do efeito inibitório do pS100A9m na mobilização de cálcio em neurônios sensoriais, o efeito deste peptídeo em culturas de neurônios DRG submetidas à eletrofisiologia também foi avaliado. Os resultados obtidos demonstraram que a perfusão dos neurônios com pS100A9m (50 µM) inibiu correntes de cálcio, sendo esse efeito irreversível, uma vez que a amplitude das correntes de cálcio nos neurônios DRG não foi restabelecida quando estas células foram lavadas com tampão de gravação, após terem sido perfundidas com o pS100A9m. Neurônios DRG expressam tanto correntes de cálcio de baixa voltagem (LVA), quanto correntes de alta voltagem (HVA). No entanto, considerando-se que o potencial de repouso utilizado para o ensaio de eletrofisiologia foi de -60 mV e o pulso-teste de 0 a +10 mV, as correntes LVA podem ser seletivamente excluídas (ALTIER et al., 2006; SUTTON et al., 2002). Em conjunto, estes dados demonstram que o pS100A9m inibe correntes de cálcio de alta voltagem, em neurônios sensoriais, sem interferir, no entanto, com os estoques intracelulares de cálcio nestas células. Ainda, uma vez que o pS00A9m não apresenta efeito quando o cálcio é transportado para os neurônios sem a participação através da membrana, sem a participação de canais iônicos, sugerem que o efeito do pS100A9m ocorra diretamente sobre os canais de cálcio, presentes nestas células.

No sistema nociceptivo, basicamente, a transmissão dos sinais nocivos é iniciada pela ativação dos nociceptores por estimulação mecânica, térmica ou química, sendo que os sinais são transmitidos pelas fibras C e Aδ aos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), seguida da transmissão para estruturas do Sistema Nervoso Central, como o tálamo, para que ocorra seu processamento (revisto por PRADO, 2001; ZAMPONI & SNUTCH, 1998; revisto por VANEGAS & SCHAIBLE, 2000; KRARUP, 2003). Nos neurônios sensoriais, a transmissão do estímulo nocivo depende de diferentes tipos de canais iônicos, como canais de sódio, de potássio e de cálcio dependentes de voltagem (VDCC), os quais regulam tanto a excitabilidade celular quanto a transmissão sináptica. (revisto por WOOLF & SALTER, 2000; revisto por JULIUS & BASBAUM, 2001; revisto por SCHOLZ & WOOLF, 2002). A transmissão de sinais dolorosos, em nível espinhal, depende intimamente dos VDCC presentes em neurônios nociceptivos, sendo os canais do tipo N e do tipo L, as quais são expressas no corno dorsal da medula espinhal, as duas populações predominantes (ZAMPONI & SNUTCH, 1998; revisto por PRADO, 2001; revisto por VANEGAS & SCHAIBLE, 2000; SUTTON et al., 2002; ALTIER et al., 2006).

Considerando-se que os resultados aqui apresentados sugerem que o efeito antinociceptivo do pS100A9m possa estar relacionado com a inibição de canais de cálcio, decidiu-se avaliar o possível envolvimento do pS100A9m sobre a modulação da sinalização deste íon, por uma ação direta em canais de cálcio. Para tanto, o pS100A9m foi avaliado sobre a sinalização de cálcio em culturas de células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N ou do tipo L. Os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m inibe o influxo de cálcio em células HEK-tsA transfectadas com VDCC do tipo N. Por outro lado, nenhum efeito foi observado quando o pS100A9m foi avaliado em células com canais do tipo L. Para se confirmar estas observações, o efeito do pS100A9m foi avaliado nas

culturas de células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio do tipo N ou do tipo L e submetidas a ensaio de eletrofisiologia. Neste protocolo experimental, mais uma vez foi observada inibição de correntes de cálcio, pelo pS100A9m, nas células transfectadas com canais do tipo N, mas não do tipo L.

Os canais de cálcio dependentes de voltagem permitem a passagem de íons em neurônios sensoriais do meio extracelular para o meio intracelular frente à despolarização, o que influencia a transmissão sináptica, essencial para a modulação de diferentes funções celulares, como liberação de neurotransmissores, excitabilidade da membrana e expressão gênica. Esses fenômenos estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a transmissão nocicecpetiva, hiperalgesia e alodinia (revisto por VANEGAS & SCHAIBLE 2000; MALMBERG & YAKSH, 1994). Dados da literatura têm demonstrado a participação de VDCC do tipo N na transmissão de sinais dolorosos em nível espinhal. Estes canais são expressos exclusivamente no tecido neuronal e sua expressão, em particular, é bastante elevada nas camadas superficiais do corno dorsal, descrita como a área nociceptiva da medula espinhal (revisto por VANEGAS & SCHAIBLE 2000). Estudos realizados com bloqueadores de VDCC do tipo N demonstraram que a inibição destes canais bloqueia a liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP (MAGGI et al., 1990; SANTICIOLI et al., 1992; SMITH et al., 2002). Foi demonstrado também que canais do tipo N são fortemente inibidos por agonistas de receptores opióides do tipo μ , como a morfina, e que animais *knockout* para genes que codificam para canais de cálcio do tipo N são menos sensíveis à dor neuropática e inflamatória, quando comparados com animais selvagens (SAEGUSA et al., 2001; HATAKEYAMA et al., 2001). Ainda, tem sido demonstrado que os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N estão envolvidos na nocicepção de curta duração, na hiperexcitabilidade, na inflamação e em neuropatias, onde o uso

de antagonistas destes receptores é capaz de deprimir as respostas ao estímulo nocivo mecânico e térmico, hiperalgesia e alodinia (revisto por VANEGAS & SCHAIBLE 2000). Os resultados aqui apresentados indicam que o efeito do C-terminal da proteína S100A9m sobre a nocicepção experimental se dê por uma inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N presentes nos neurônios sensoriais.

Como descrito no início da discussão, o peptídeo Ac E_{97} -G₁₀₂ apresentou-se como a menor seqüência com efeito inibitório semelhante ao pS100A9m, sobre a nocicepção experimental. Desta forma, este peptídeo também foi avaliado sobre a hiperalgesia induzida pela ativação de PAR₂. Os resultados aqui obtidos demonstraram que da mesma forma que o pS100A9m, o Ac E^{97} -G¹⁰² inibe a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas por PAR₂AP. Cabe ressaltar que este peptídeo induziu efeito inibitório em todos os tempos avaliados, demonstrando que o Ac E^{97} -G¹⁰² possui um efeito mais prolongado que o pS100A9m. Ainda, o Ac E^{97} -G¹⁰² também inibiu o influxo de cálcio nos neurônios sensoriais frente a todos os agonistas utilizados, com exceção da capsaicina. Quando o Ac E^{97} -G¹⁰² foi avaliado no influxo de cálcio em células HEK-tsA transfectadas com canais de cálcio dependentes de voltagem, foi observada inibição apenas nas culturas de células transfectadas com canais do tipo N. Esses dados demonstram que o peptídeo Ac E^{97} -G¹⁰² reproduz todos os efeitos observados com o pS100A9m, sugerindo que a porção ativa do C-terminal da proteína S100A9 relacionada com a inibição da nocicepção experimental está localizada entre os aminoácidos E^{97} -G¹⁰² da molécula da S100A9 murina.

Em conclusão, nossos dados demonstram evidências que, o C-terminal da proteína S100A9 exibe propriedades antinociceptivas frente à nocicepção experimental induzida por PAR₂, sendo este efeito independente das propriedades antiinflamatórias da proteína. Ainda, nossos resultados sugerem que o pS100A9m sinaliza diretamente para neurônios sensoriais, os quais estão intimamente envolvidos com a resposta nociceptiva e são apontados como alvos

celulares importantes para os efeitos da S100A9. Em adição, o efeito do C-terminal da proteína S100A9 e, principalmente da região E^{97} - G^{102} , sobre a nocicepção experimental é provavelmente decorrente da inibição e/ou inativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N. Considerando a importância da participação de VDCC do tipo N na mediação da fisiopatologia da resposta dolorosa, nossos resultados evidenciam o C-terminal da proteína S100A9 como uma importante ferramenta terapêutica no controle da dor e reforçam o papel proeminente da proteína S100A9, bem como do seu fragmento C-terminal, na modulação da resposta nociceptiva.

Entender os mecanismos de ação da S100A9, bem como do pS100A9m sobre canais de cálcio, na modulação da fisiopatologia da inflamação e nocicepção representa, sem dúvida, o próximo desafio neste campo.

Resumo dos

resultados obtídos

6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

- O peptídeo idêntico ao C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) inibe a hiperalgesia induzida por carragenina em ratos, sendo que a seqüência responsável por este efeito está localizada nos aminoácidos da posição E⁹⁷-G¹⁰²;
- O pS100A9m inibe, em diferentes concentrações, a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela ativação de receptor ativado por protease do tipo 2 (PAR₂), quando administrado concomitante ou 30 minutos antes do peptídeo agonista seletivo de PAR₂ (PAR₂AP);
- O pS100A9m inibe a ativação nociceptiva em nível espinhal induzida por PAR₂, demonstrada pela inibição da expressão do proto-oncogene *egr-1* no corno dorsal da medula espinhal de ratos injetados com PAR₂AP;
- O pS100A9m inibe a mobilização de cálcio em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinhal de ratos em resposta à tripsina, PAR₂AP, bradicinina, capsaicina ou KCl, sugerindo um efeito direto do pS100A9m em neurônios sensoriais;
- O pS100A9m inibe a liberação de substância P induzida por agonista de PAR₂ em neurônios sensoriais, reforçando o efeito do pS100A9m sobre neurônios sensoriais;
- O pS100A9m não interfere com a ativação de PAR₂ em células HEK-293, que naturalmente expressam PAR₂ ou em células KNRK transfectadas com PAR₂;
- O efeito do pS100A9m em neurônios sensoriais é decorrente da inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N;
- O peptídeo AcE⁹⁷-G¹⁰² corresponde à porção do pS100A9m responsável pelos efeitos inibitórios observados sobre ativação de PAR₂, o qual reproduz as atividades demonstradas com o pS100A9m sobre neurônios sensoriais, incluindo a inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N.
Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram pela primeira vez, que o C-terminal da proteína S100A9 e, principalmente a região E^{97} - G^{102} , interferem com mecanismos envolvidos na nocicepção e hiperalgesia por uma modulação direta do sinal nociceptivo, em neurônios sensoriais, via inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N. Considerando-se importância dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N na modulação do processo doloroso, os dados aqui apresentados revelam a proteína S100A9, bem como seu fragmento C-terminal, como uma nova ferramenta a ser empregada para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da dor.

Referências Bíblíográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALTIER, C.; KHOSRAVANI, H.; EVANS, R. M.; HAMEED, S.; PELOQUIN, J. B.; VARTIAN, B. A.; CHEN, L.; BEEDLE, A. M.; FERGUSON, S. S.; MEZGHRANI, A.; DUBEL, S. J.; BOURINET, E.; MCRORY, J. E.; ZAMPONI, G. W. ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. **Nat Neurosci**, v.9, n.1, p. 31-40, 2006.

ALTIER, C.; ZAMPONI, G. W. Targeting Ca2+ channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n.9, p. 465-470, 2004.

AMORIN-DIAS, M. A. **Participação da proteína ligante de cálcio MRP-14 na atividade de macrófagos inflamatórios** *in vivo***.** 2001. [Tese de Doutorado]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2001.

ANDERSSON, K. B.; SLETTEN, K.; BERNTZEN, H. B.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; JELLUM, E.; FAGERHOL, M. K. The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. **Scand J Immunol**, v.28, n.2, p. 241-245, 1988.

BEEDLE, A. M.; MCRORY, J. E.; POIROT, O.; DOERING, C. J.; ALTIER, C.; BARRERE, C.; HAMID, J.; NARGEOT, J.; BOURINET, E.; ZAMPONI, G. W. Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. **Nat Neurosci**, v.7, n.2, p. 118-125, 2004.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. Lancet, v.353, n.9164, p. 1610-1615, 1999.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. J **Exp Med**, v.174, n.6, p. 1549-1555, 1991.

BOHM, S. K.; KONG, W.; BROMME, D.; SMEEKENS, S. P.; ANDERSON, D. C.; CONNOLLY, A.; KAHN, M.; NELKEN, N. A.; COUGHLIN, S. R.; PAYAN, D. G.; BUNNETT, N. W. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. **Biochem J**, v.314 (Pt 3), p. 1009-1016, 1996.

BRUN, J. G.; HALAND, G.; HAGA, H. J.; FAGERHOL, M. K.; JONSSON, R. Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. **Apmis**, v.103, n.3, p. 233-240, 1995.

BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain. **Semin Thromb Hemost**, v.32 Suppl 1, p. 39-48, 2006.

BURITOVA, J.; HONORE, P.; BESSON, J. M. Indomethacin reduces both Krox-24 expression in the rat lumbar spinal cord and inflammatory signs following intraplantar carrageenan. **Brain Res**, v.674, n.2, p. 211-220, 1995.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v.87, n.1, p. 1-5, 2000.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, n.6653, p. 816-824, 1997.

CENAC, N.; COELHO, A. M.; NGUYEN, C.; COMPTON, S.; ANDRADE-GORDON, P.; MACNAUGHTON, W. K.; WALLACE, J. L.; HOLLENBERG, M. D.; BUNNETT, N. W.; GARCIA-VILLAR, R.; BUENO, L.; VERGNOLLE, N. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. **Am J Pathol**, v.161, n.5, p. 1903-1915, 2002.

CENAC, N.; GARCIA-VILLAR, R.; FERRIER, L.; LARAUCHE, M.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; COELHO, A. M.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. **J Immunol**, v.170, n.8, p. 4296-4300, 2003.

CICALA, C.; PINTO, A.; BUCCI, M.; SORRENTINO, R.; WALKER, B.; HARRIOT, P.; CRUCHLEY, A.; KAPAS, S.; HOWELLS, G. L.; CIRINO, G. Protease-activated receptor-2 involvement in hypotension in normal and endotoxemic rats in vivo. **Circulation**, v.99, n.19, p. 2590-2597, 1999.

COELHO, A. M.; VERGNOLLE, N.; GUIARD, B.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. **Gastroenterology**, v.122, n.4, p. 1035-1047, 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. C.**Acute and chronic Inflammation** In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. C., editors. Pathologic Basis of Disease: W.S.C. Phyladelphia, 1999.

COUGHLIN, S. R.; CAMERER, E. PARticipation in inflammation. J Clin Invest, v.111, n.1, p. 25-27, 2003.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, v.104, n.3, p. 765-767, 1991.

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

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; VEIGA, F. H.; FERREIRA, S. H. Cytokinemediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br J Pharmacol**, v.126, n.1, p. 45-50, 1999.

DALE, C. S. Avaliação do efeito antinociceptivo de peptídeo sintético homólogo à porção Cterminal da proteína ligante de cálcio MRP-14 murina em modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por proteases. 2002. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DALE, C. S.; CENAC, N.; BRITTO, L. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VERGNOLLE, N.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR(2)). **Br J Pharmacol**, v.149, n.4, p. 374-384, 2006b.

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

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

DE GARAVILLA, L.; VERGNOLLE, N.; YOUNG, S. H.; ENNES, H.; STEINHOFF, M.; OSSOVSKAYA, V. S.; D'ANDREA, M. R.; MAYER, E. A.; WALLACE, J. L.; HOLLENBERG, M. D.; ANDRADE-GORDON, P.; BUNNETT, N. W. Agonists of proteinaseactivated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. **Br J Pharmacol**, v.133, n.7, p. 975-987, 2001.

DELABIE, J.; DE WOLF-PEETERS, C.; VAN DEN OORD, J. J.; DESMET, V. J. Differential expression of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in granulomatous conditions: an immunohistochemical study. **Clin Exp Immunol**, v.81, n.1, p. 123-126, 1990.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33, n.7, p. 637-668, 2001.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. Br J Anaesth, v.75, n.2, p. 125-131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can J Physiol Pharmacol,** v.75, n.6, p. 704-712, 1997.

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **Trends Pharmacol Sci**, v.14, n.8, p. 287-290, 1993.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol Sci**, v.15, n.6, p. 190-197, 1994.

EDGEWORTH, J.; FREEMONT, P.; HOGG, N. Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14. **Nature**, v.342, n.6246, p. 189-192, 1989.

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

EUE, I.; PIETZ, B.; STORCK, J.; KLEMPT, M.; SORG, C. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. **Int Immunol**, v.12, n.11, p. 1593-1604, 2000.

FERREIRA, S. H. A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action In: SANDLER, M., COLLINS, G. M., editors. Migraine: spectrum of ideas: Oxford University press, 1990.

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

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.110, n.3, p. 1227-1231, 1993.

FOELL, D.; FROSCH, M.; SORG, C.; ROTH, J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clin Chim Acta**, v.344, n.1-2, p. 37-51, 2004.

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

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

HAMILTON, J. R.; COCKS, T. M. Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. **Br J Pharmacol**, v.130, n.1, p. 181-188, 2000.

HAMILTON, J. R.; MOFFATT, J. D.; FRAUMAN, A. G.; COCKS, T. M. Protease-activated receptor (PAR) 1 but not PAR2 or PAR4 mediates endothelium-dependent relaxation to thrombin and trypsin in human pulmonary arteries. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.38, n.1, p. 108-119, 2001.

HAMILTON, J. R.; MOFFATT, J. D.; TATOULIS, J.; COCKS, T. M. Enzymatic activation of endothelial protease-activated receptors is dependent on artery diameter in human and porcine isolated coronary arteries. **Br J Pharmacol**, v.136, n.4, p. 492-501, 2002.

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

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance p. Int J Biochem Cell Biol, v.33, n.6, p. 555-576, 2001.

HATAKEYAMA, S.; WAKAMORI, M.; INO, M.; MIYAMOTO, N.; TAKAHASHI, E.; YOSHINAGA, T.; SAWADA, K.; IMOTO, K.; TANAKA, I.; YOSHIZAWA, T.; NISHIZAWA, Y.; MORI, Y.; NIIDOME, T.; SHOJI, S. Differential nociceptive responses in mice lacking the alpha(1B) subunit of N-type Ca(2+) channels. **Neuroreport**, v.12, n.11, p. 2423-2427, 2001.

HERDEGEN, T.; KOVARY, K.; LEAH, J.; BRAVO, R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. **J Comp Neurol**, v.313, n.1, p. 178-191, 1991.

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

HESSIAN, P. A.; WILKINSON, L.; HOGG, N. The S100 family protein MRP-14 (S100A9) has homology with the contact domain of high molecular weight kininogen. **FEBS Lett,** v.371, n.3, p. 271-275, 1995.

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

HOLLENBERG, M. D.; SAIFEDDINE, M.; AL-ANI, B.; KAWABATA, A. Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides. **Can J Physiol Pharmacol,** v.75, n.7, p. 832-841, 1997. HOOGERWERF, W. A.; SHENOY, M.; WINSTON, J. H.; XIAO, S. Y.; HE, Z.; PASRICHA, P. J. Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: a potentially novel role in pancreatic pain. **Gastroenterology**, v.127, n.3, p. 883-891, 2004.

HOOGERWERF, W. A.; ZOU, L.; SHENOY, M.; SUN, D.; MICCI, M. A.; LEE-HELLMICH, H.; XIAO, S. Y.; WINSTON, J. H.; PASRICHA, P. J. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. **J Neurosci**, v.21, n.22, p. 9036-9042, 2001.

HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v.328, n.6131, p. 632-634, 1987.

JESSEL, T. M.; KELLY, D. D.**Pain and analgesia** In: KANDELL, E. R., SCHAWRTZ, J. H., JESSEL, T. M., editors. Principles of Neural Science. 3 ed, 1991.

JORGE, S.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; TAMBELI, C. H. Interferential therapy produces antinociception during application in various models of inflammatory pain. **Phys Ther**, v.86, n.6, p. 800-808, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p. 203-210, 2001.

KANNAN, S. Inflammation: a novel mechanism for the transport of extracellular nucleotideinduced arachidonic acid by S100A8/A9 for transcellular metabolism. **Cell Biol Int,** v.27, n.7, p. 593-595, 2003.

KAWABATA, A.; KINOSHITA, M.; NISHIKAWA, H.; KURODA, R.; NISHIDA, M.; ARAKI, H.; ARIZONO, N.; ODA, Y.; KAKEHI, K. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. **J Clin Invest**, v.107, n.11, p. 1443-1450, 2001.

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

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

KIRKUP, A. J.; JIANG, W.; BUNNETT, N. W.; GRUNDY, D. Stimulation of proteinaseactivated receptor 2 excites jejunal afferent nerves in anaesthetised rats. **J Physiol**, v.552, n.Pt 2, p. 589-601, 2003.

KLEMPT, M.; MELKONYAN, H.; NACKEN, W.; WIESMANN, D.; HOLTKEMPER, U.; SORG, C. The heterodimer of the Ca2+-binding proteins MRP8 and MRP14 binds to arachidonic acid. **FEBS Lett**, v.408, n.1, p. 81-84, 1997.

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

KRARUP, C. An update on electrophysiological studies in neuropathy. **Curr Opin Neurol**, v.16, n.5, p. 603-612, 2003.

LAGASSE, E.; CLERC, R. G. Cloning and expression of two human genes encoding calciumbinding proteins that are regulated during myeloid differentiation. **Mol Cell Biol**, v.8, n.6, p. 2402-2410, 1988.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells,** v.20, n.3, p. 315-324, 2005.

LEVINE, J. D.; FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J Neurosci**, v.13, n.6, p. 2273-2286, 1993.

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

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

LEVINE, J. D.; REICHLING, D. B. **Peripheral mechanisms of inflammatory pain** In: LIVINGSTONE, editor. Textbook of Pain. 4 ed. Edinburg: Harcout Publishers Limited, 1999.

LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; VEIGA, F. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Cytokinemediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13. **Eur Cytokine Netw**, v.12, n.2, p. 260-267, 2001.

LUCKASEN, J. R.; WHITE, J. G.; KERSEY, J. H. Mitogenic properties of a calcium ionophore, A23187. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.71, n.12, p. 5088-5090, 1974.

MAGGI, C. A.; TRAMONTANA, M.; CECCONI, R.; SANTICIOLI, P. Neurochemical evidence for the involvement of N-type calcium channels in transmitter secretion from peripheral endings of sensory nerves in guinea pigs. **Neurosci Lett,** v.114, n.2, p. 203-206, 1990.

MAJOR, C. D.; SANTULLI, R. J.; DERIAN, C. K.; ANDRADE-GORDON, P. Extracellular mediators in atherosclerosis and thrombosis: lessons from thrombin receptor knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, n.6, p. 931-939, 2003.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. **J** Neurosci, v.14, n.8, p. 4882-4890, 1994.

MIIKE, S.; MCWILLIAM, A. S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **J Immunol**, v.167, n.11, p. 6615-6622, 2001.

NACKEN, W.; ROTH, J.; SORG, C.; KERKHOFF, C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. **Microsc Res Tech**, v.60, n.6, p. 569-580, 2003.

NACKEN, W.; SOPALLA, C.; PROPPER, C.; SORG, C.; KERKHOFF, C. Biochemical characterization of the murine S100A9 (MRP14) protein suggests that it is functionally equivalent to its human counterpart despite its low degree of sequence homology. **Eur J Biochem**, v.267, n.2, p. 560-565, 2000.

NEURATH, H.**The diversity of proteolytic enzymes** In: BEYNON, R. J., BOND, J. S., editors. Proteolytic enzymes, a pratical aproach: Oxford University Press, 1989.

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

NYSTEDT, S.; EMILSSON, K.; WAHLESTEDT, C.; SUNDELIN, J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.20, p. 9208-9212, 1994.

NYSTEDT, S.; RAMAKRISHNAN, V.; SUNDELIN, J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. **J Biol Chem**, v.271, n.25, p. 14910-14915, 1996.

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

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. **Physiol Rev**, v.84, n.2, p. 579-621, 2004.

PACCOLA, C. C.; DALE, C. S.; GUTIÉRREZ, V. P.; LONGO, I.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIORGI, R. Effect of synthetic peptide identical to C-terminus of the murine S100A9 (MRP-14) protein on experimental neuropathic pain.; Rio de Janeiro, Brazil. 2004.

PAGANO, R. L. **Participação da proteína ligante de cálcio MRP-14 no controle da dor inflamatória em peritonite neutrofílica induzida por carragenina ou zimozan em camundongos.** 2001. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PAGANO, R. L. A porção C-terminal da proteína S100A9 murina inibe a fagocitose por céuls peritoneais aderentes via células B-1. 2005. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v.11, n.4, p. 203-210, 2005.

PAGANO, R. L.; MARIANO, M.; GIORGI, R. Neutrophilic Cell-Free Exudate Induces Antinociception Mediate by the Protein S100A9. **Mediators Inflamm,** v.2006, n.4, p. 36765, 2006.

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

PALMER, D. G.; HOGG, N.; ALLEN, C. A.; HIGHTON, J.; HESSIAN, P. A. A mononuclear phagocyte subset associated with cell necrosis in rheumatoid nodules: identification with monoclonal antibody 5.5. **Clin Immunol Immunopathol**, v.45, n.1, p. 17-28, 1987.

POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Cytokinemediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br J Pharmacol**, v.115, n.4, p. 684-688, 1995.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.4, p. 449-461, 2001.

PROPPER, C.; HUANG, X.; ROTH, J.; SORG, C.; NACKEN, W. Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the Cterminal domain of S100 proteins in dimer formation. **J Biol Chem**, v.274, n.1, p. 183-188, 1999.

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

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

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.111, n.4, p. 409-419, 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITLER, J. M.**Fármacos analgésicos** In: KOOGAN, G., editor. Farmacologia. Rio de Janeiro. p 485-504, 1997.

REED, D. E.; BARAJAS-LOPEZ, C.; COTTRELL, G.; VELAZQUEZ-ROCHA, S.; DERY, O.; GRADY, E. F.; BUNNETT, N. W.; VANNER, S. J. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. **J Physiol**, v.547, n.Pt 2, p. 531-542, 2003.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v.387, n.1, p. 111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v.60, n.6, p. 404-415, 2001.

ROTH, J.; BURWINKEL, F.; VAN DEN BOS, C.; GOEBELER, M.; VOLLMER, E.; SORG, C. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. **Blood**, v.82, n.6, p. 1875-1883, 1993.

ROTH, J.; VOGL, T.; SORG, C.; SUNDERKOTTER, C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. **Trends Immunol**, v.24, n.4, p. 155-158, 2003.

ROY, S. S.; SAIFEDDINE, M.; LOUTZENHISER, R.; TRIGGLE, C. R.; HOLLENBERG, M. D. Dual endothelium-dependent vascular activities of proteinase-activated receptor-2-activating peptides: evidence for receptor heterogeneity. **Br J Pharmacol**, v.123, n.7, p. 1434-1440, 1998.

RYCKMAN, C.; MCCOLL, S. R.; VANDAL, K.; DE MEDICIS, R.; LUSSIER, A.; POUBELLE, P. E.; TESSIER, P. A. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. **Arthritis Rheum**, v.48, n.8, p. 2310-2320, 2003.

SAADE, N. E.; NASR, I. W.; MASSAAD, C. A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; JABBUR, S. J.; KANAAN, S. A. Modulation of ultraviolet-induced hyperalgesia and cytokine upregulation by interleukins 10 and 13. **Br J Pharmacol**, v.131, n.7, p. 1317-1324, 2000.

SAEGUSA, H.; KURIHARA, T.; ZONG, S.; KAZUNO, A.; MATSUDA, Y.; NONAKA, T.; HAN, W.; TORIYAMA, H.; TANABE, T. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca2+ channel. **Embo J**, v.20, n.10, p. 2349-2356, 2001.

SANTICIOLI, P.; DEL BIANCO, E.; TRAMONTANA, M.; GEPPETTI, P.; MAGGI, C. A. Release of calcitonin gene-related peptide like-immunoreactivity induced by electrical field stimulation from rat spinal afferents is mediated by conotoxin-sensitive calcium channels. **Neurosci Lett,** v.136, n.2, p. 161-164, 1992.

SCHAFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. **Trends Biochem Sci**, v.21, n.4, p. 134-140, 1996.

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

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. Langenbecks Arch Surg, v.389, n.4, p. 237-243, 2004.

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

SMITH, M. T.; CABOT, P. J.; ROSS, F. B.; ROBERTSON, A. D.; LEWIS, R. J. The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. **Pain**, v.96, n.1-2, p. 119-127, 2002.

SOHNLE, P. G.; COLLINS-LECH, C.; WIESSNER, J. H. The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. **J Infect Dis,** v.164, n.1, p. 137-142, 1991.

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

SOUTHAN, C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. **Drug Discov Today**, v.6, n.13, p. 681-688, 2001.

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

STEINHOFF, M.; VERGNOLLE, N.; YOUNG, S. H.; TOGNETTO, M.; AMADESI, S.; ENNES, H. S.; TREVISANI, M.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L.; CAUGHEY, G. H.; MITCHELL, S. E.; WILLIAMS, L. M.; GEPPETTI, P.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N. W. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nat Med,** v.6, n.2, p. 151-158, 2000.

STRIZ, I.; TREBICHAVSKY, I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. **Physiol Res**, v.53, n.3, p. 245-253, 2004.

SUTTON, K. G.; MARTIN, D. J.; PINNOCK, R. D.; LEE, K.; SCOTT, R. H. Gabapentin inhibits high-threshold calcium channel currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. **Br J Pharmacol**, v.135, n.1, p. 257-265, 2002.

THASTRUP, O.; CULLEN, P. J.; DROBAK, B. K.; HANLEY, M. R.; DAWSON, A. P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.7, p. 2466-2470, 1990.

VAN DEN BOS, C.; ROTH, J.; KOCH, H. G.; HARTMANN, M.; SORG, C. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. **J Immunol**, v.156, n.3, p. 1247-1254, 1996.

VANDAL, K.; ROULEAU, P.; BOIVIN, A.; RYCKMAN, C.; TALBOT, M.; TESSIER, P. A. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. **J Immunol**, v.171, n.5, p. 2602-2609, 2003.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**, v.85, n.1-2, p. 9-18, 2000.

VERGNOLLE, N. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. **J Immunol**, v.163, n.9, p. 5064-5069, 1999.

VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; SHARKEY, K. A.; BRUSSEE, V.; COMPTON, S. J.; GRADY, E. F.; CIRINO, G.; GERARD, N.; BASBAUM, A. I.; ANDRADE-GORDON, P.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. **Nat Med,** v.7, n.7, p. 821-826, 2001b.

VERGNOLLE, N.; DERIAN, C. K.; D'ANDREA, M. R.; STEINHOFF, M.; ANDRADE-GORDON, P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. **J Immunol**, v.169, n.3, p. 1467-1473, 2002.

VERGNOLLE, N.; FERAZZINI, M.; D'ANDREA, M. R.; BUDDENKOTTE, J.; STEINHOFF, M. Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. **Trends Neurosci**, v.26, n.9, p. 496-500, 2003.

VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M. D.; SHARKEY, K. A.; WALLACE, J. L. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. **Br J Pharmacol**, v.127, n.5, p. 1083-1090, 1999.

VERGNOLLE, N.; WALLACE, J. L.; BUNNETT, N. W.; HOLLENBERG, M. D. Proteaseactivated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. **Trends Pharmacol Sci**, v.22, n.3, p. 146-152, 2001a.

VOGL, T.; LUDWIG, S.; GOEBELER, M.; STREY, A.; THOREY, I. S.; REICHELT, R.; FOELL, D.; GERKE, V.; MANITZ, M. P.; NACKEN, W.; WERNER, S.; SORG, C.; ROTH, J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. **Blood**, v.104, n.13, p. 4260-4268, 2004.

WATT, K. W.; BRIGHTMAN, I. L.; GOETZL, E. J. Isolation of two polypeptides comprising the neutrophil-immobilizing factor of human leucocytes. **Immunology**, v.48, n.1, p. 79-86, 1983.

WOOD, J. N. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. **Gut,** v.53 Suppl 2, p. ii9-12, 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science, v.288, n.5472, p. 1765-1769, 2000.

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

YUI, S.; MIKAMI, M.; TSURUMAKI, K.; YAMAZAKI, M. Growth-inhibitory and apoptosisinducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. **J Leukoc Biol**, v.61, n.1, p. 50-57, 1997.

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

YUI, S.; NAKATANI, Y.; HUNTER, M. J.; CHAZIN, W. J.; YAMAZAKI, M. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. **Mediators Inflamm,** v.11, n.3, p. 165-172, 2002.

ZAMPONI, G. W.; SNUTCH, T. P. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. **Curr Opin Neurobiol**, v.8, n.3, p. 351-356, 1998.

ZHU, W. J.; YAMANAKA, H.; OBATA, K.; DAI, Y.; KOBAYASHI, K.; KOZAI, T.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. Expression of mRNA for four subtypes of the proteinase-activated receptor in rat dorsal root ganglia. **Brain Res,** v.1041, n.2, p. 205-211, 2005.

ZIMMER, D. B.; CORNWALL, E. H.; LANDAR, A.; SONG, W. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res Bull**, v.37, n.4, p. 417-429, 1995.

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

Apêndíce

RESEARCH PAPER

The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR₂)

CS Dale¹, N Cenac², LRG Britto³, MA Juliano⁴, L Juliano⁴, N Vergnolle² and R Giorgi¹

¹Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil; ²Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada; ³Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and ⁴Department of Biophysics, Pharmacology Institute, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Background and purpose: S100A9 protein induces anti-nociception in rodents, in different experimental models of inflammatory pain. Herein, we investigated the effects of a fragment of the C-terminus of S100A9 (mS100A9p), on the hyperalgesia induced by serine proteases, through the activation of protease-activated receptor-2 (PAR₂).

Experimental approach: Mechanical and thermal hyperalgesia induced by PAR₂ agonists (SLIGRL-NH₂ and trypsin) was measured in rats submitted to the paw pressure or plantar tests, and Egr-1 expression was determined by immunohistochemistry in rat spinal cord dorsal horn. Calcium flux in human embryonic kidney cells (HEK), which naturally express PAR₂, in Kirsten virus-transformed kidney cells, transfected (KNRK-PAR₂) or not (KNRK) with PAR₂, and in mouse dorsal root ganglia neurons (DRG) was measured by fluorimetric methods.

Key results: mS100A9p inhibited mechanical hyperalgesia induced by trypsin, without modifying its enzymatic activity. Mechanical and thermal hyperalgesia induced by SLIGRL-NH₂ were inhibited by mS100A9p. SLIGRL-NH₂ enhanced Egr-1 expression, a marker of nociceptor activation, and this effect was inhibited by concomitant treatment with mS100A9p. mS100A9p inhibited calcium mobilization in DRG neurons in response to the PAR₂ agonists trypsin and SLIGRL-NH₂, but also in response to capsaicin and bradykinin, suggesting a direct effect of mS100A9 on sensory neurons. No effect on the calcium flux induced by trypsin or SLIGRL in HEK cells or KNRK-PAR₂ cells was observed.

Conclusions and implications: These data demonstrate that mS100A9p interferes with mechanisms involved in nociception and hyperalgesia and modulates, possibly directly on sensory neurons, the PAR₂-induced nociceptive signal.

British Journal of Pharmacology (2006) 149, 374–384. doi:10.1038/sj.bjp.0706884; published online 11 September 2006

Keywords: S100A9; antinociception; hyperalgesia; inflammation; PAR₂; Egr-1; DRG neurons; HEK cells; KNRK-PAR₂ cells

Abbreviations: ANOVA, one-way analysis of variance; *egr-1* gene, early growth response-1 gene; DRG neurons, dorsal root ganglia neurons; HEK cells, human embryonic kidney cells; KNRK, Kirsten virus-transformed kidney; KNRK-PAR₂, Kirsten virus-transformed kidney PAR₂ transfected cells; NIF, neutrophil immobilizing factor; PAR, protease-activated receptor

Introduction

The S100A9 protein belongs to the family of S-100 proteins (Schäfer *et al.*, 1995; Zimmer *et al.*, 1995). It is composed of two calcium-binding motifs (Hessian *et al.*, 1993), and forms a heterodimeric complex with the S100A8 protein, which is then called calprotectin (Steinbakk *et al.*, 1990). S100A8 and S100A9 proteins are highly conserved, presenting 60–80% homology between human, rat and mouse (Edgeworth *et al.*, *al.*, *al*

E-mail: nvergnol@ucalgary.ca

1991). Both proteins are expressed in circulating neutrophils and monocytes, where they represent 45 and 1% of the total cytosolic proteins of these cells, respectively (Hogg *et al.*, 1989). Calprotectin is found in high concentrations in body fluids of patients with acute and chronic inflammatory diseases (Sorg, 1992; Brun *et al.*, 1994; Golden *et al.*, 1996). From these studies, the use of calprotectin as a diagnostic marker of inflammation in noninfectious inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease has been proposed (Foell *et al.*, 2004; Striz and Trebichavsky, 2004).

As of its increased expression in inflammatory settings, studies have investigated the effects of calprotectin, S100A8

Correspondence: Dr N Vergnolle, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Calgary, 3330 Hospital Drive NW, Calgary, Alberta, Canada T2N4N1.

Received 22 May 2006; accepted 1 August 2006; published online 11 September 2006

and S100A9 on different inflammatory parameters. Calprotectin induces a marked anti-inflammatory effect in a model of adjuvant-induced arthritis in rats (Brun et al., 1995), and modulates the growth and apoptotic activity of fibroblasts. These effects are physiologically controlled by metallic ions (Yui et al., 1997). S100A9 alone seems to play a prominent role in leukocyte trafficking, having chemotactic and proadhesive properties for neutrophils (Ryckman et al., 2003), and blockade of S100A9 suppressed neutrophil migration in response to lipopolysaccharide (Vandal et al., 2003). While these results suggest a proinflammatory role for \$100A9, other studies have shown anti-inflammatory properties. For instance, S100A9, but not S100A8, deactivates activated peritoneal macrophages (Aguiar-Passeti et al., 1997). S100A9 released by neutrophils can reduce inflammatory pain in a model of neutrophilic peritonitis induced by glycogen or carrageenan in mice (Giorgi et al., 1998; Pagano et al., 2002). Further studies have determined that the C-terminal domain of the murine calcium-binding

the C-terminal domain of the murine calcium-binding protein S100A9 (mS100A9p) reproduced several anti-inflammatory and antinociceptive properties of the full-length protein S100A9. mS100A9p inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells (Pagano *et al.*, 2005) and inhibits hyperalgesia induced by jararhagin, a metalloproteinase isolated from the *Bothrops jararaca* venom (Dale *et al.*, 2004). However, to date, the antinociceptive effects of S100A9 have never been dissociated from its anti-inflammatory properties. It is not clear whether the antinociceptive properties of S100A9 are due to a general reduction of inflammation or whether S100A9 has analgesic properties.

Among the many mediators involved in inflammation, proteases have been identified as important actors, which can induce both edema and inflammatory cells recruitment and have a direct pronociceptive effect on sensory neurons (Vergnolle et al., 1999, 2001b, 2003; Kirkup et al., 2003). The effects of proteases on inflammation and pain parameters are mediated, at least in part, by the activation of proteaseactivated receptor-2 (PAR₂). PAR₂ is a G protein-coupled receptor that is activated by a unique mechanism whereby proteases such as trypsin or mast cell tryptase hydrolyze, at a specific cleavage site, the extra cellular N-terminus of the receptor. This cleavage exposes a new N-terminus that acts as a tethered ligand, which binds intramolecularly to initiate cellular signals (Nystedt et al., 1994; Bohm et al., 1996; Hollenberg et al., 1997; Vergnolle et al., 2003). Data obtained with the agonist peptide for PAR₂, corresponding to the tethered ligand domain of the receptor (SLIGRL-NH₂) have shown that PAR₂ activation induces hyperalgesia independently of inflammation (Vergnolle et al., 2001a). Doses of PAR₂ agonists that did not cause signs of inflammation (no edema, no increase in granulocyte recruitment or vasodilatation), were able to provoke profound and long-lasting thermal and mechanical hyperalgesia (Vergnolle et al., 2001a). We wanted to use this particular property of PAR_2 activation to define potential direct analgesic properties for S100A9 that would be independent from its anti-inflammatory effect.

The present study aimed at investigating the effects of the C-terminal fragment of S100A9 against hyperalgesia and sensory neuron activation induced by PAR₂ agonists.

Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 170–180 g and male C57Bl6 mice were used throughout this study. Animals were maintained under controlled light cycle (12/12 h) and temperature ($22\pm2^{\circ}$ C) with free access to food and water. The study was conducted in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, and was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation.

Mechanical nociception

Nociceptive response to pressure was measured using an Ugo Basile paw pressure apparatus, as described by Randall and Selitto (1957). After measuring the baseline threshold (force at which rats before any treatment withdraw their paw), trypsin ($50 \mu g$), saline (0.9% NaCl), SLIGRL ($10 \mu g$) and/or mS100A9p (1, 4 or $8 \mu g$) were injected (injection volume $100 \mu l$) by the intraplantar (i.pl.) route in rats. Mechanical hyperalgesia was defined as a decrease of the threshold (force in g) required to induce paw withdrawal. Thresholds for paw withdrawal were measured in rats at different times after i.pl. injection.

Thermal nociception

Paw withdrawal latency to radiant heat stimulus was measured using an Ugo Basile Plantar test essentially as described by Hargreaves *et al.* (1988). Withdrawal latency of rats was measured before and after the i.pl. injection of SLIGRL ($10 \mu g$ in $100 \mu l$) and/or mS100A9p (0.1, 1 or $20 \mu g$ in $100 \mu l$). Thermal hyperalgesia was defined as a significant decrease of the withdrawal latency, compared to basal measurement (time 0, before i.pl. injection).

Trypsin enzymatic activity assay

Enzymatic activity of trypsin was evaluated on chromogenic substrate BAPNA ($N\alpha$ -benzoyl-DL-p-nitroanilide – Sigma). Trypsin at the dose of 50 μ g or trypsin together with 50 μ g of soybean trypsin inhibitor (SBTI) or trypsin with 1 or 4 μ g of mS100A9p were added to 500 μ l of 0.05 M of Tris-HCl buffer, pH 5.8 and incubated for 30 min at 37°C. After this incubation, the solutions were added to 1 ml of BAPNA (1 mM) and were incubated for 15 min at 37°C. The reactions were terminated with 30% acetic acid. The optical density of the incubation mixture was measured using a spectro-photometer, at 405 nm.

Immunohistochemistry

At 3 h after the i.pl. injection of SLIGRL $(10 \mu g)$ or the concomitant injection of SLIGRL and mS100A9p $(4 \mu g)$, rats were transcardially perfused with phosphate-buffered saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). The spinal cord (L4 and L5) was removed, left in the same fixative for 5–8 h and then cryoprotected overnight in 30% sucrose. Frozen sections $(30 \mu m)$ were immunostained for Egr-1 expression. The spinal cord sections were incubated

free floating with a rabbit polyclonal antibody against the nuclear protein, which is the product of the early growth response-1 gene (egr-1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and diluted 1:200 in PB containing 0.3% Triton X-100 plus 5% of normal goat serum. Incubation with the primary antibody was conducted overnight at 24°C. After three washes (10 min each) in PB, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit sera (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) diluted 1:200 in PB for 2 h at 24°C. The sections were washed again in PB and incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite; Vector Labs). After the reaction with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine and a 0.01% solution of hydrogen peroxide in PB and intensification with 0.05% osmium tetroxide in water, the sections were mounted on gelatin- and chromoalumencoated slides, dehydrated, cleared, and coverslipped. The material was then examined with a light microscope, and digital images were collected. A quantitative analysis of the immunolabeled material was performed with NIH Image. The number of Egr-1 immunoreactive neurons of the right dorsal horn (treated side) was compared with the left side, to obtain the difference between treated and nontreated sides. The results were compared and subjected to statistical analysis.

Calcium signal in PAR₂-expressing cells

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were maintained in 75 cm⁻² T-flasks in minimum essential media (MEM – Gibco, Invitrogen Corporation, NY, USA), containing (v/v) 5% fetal bovine serum, 1% horse serum and 1% penicillin-streptomycin solution (PSS) – Sigma, St Louis, MO, USA). Kirsten virus-transformed kidney cells stably expressing PAR₂ cells (KNRK-PAR₂) were used as previously described (Vergnolle *et al.*, 1998), and maintained in 75 cm⁻² T-flasks Dubelco's modified eagle medium (DMEM – Gibco), containing 5% v/v fetal calf serum, 1% geneticin (Gibco) and 1% PSS.

Cells were harvested at confluence to be used for trypsin or SLIGRL-induced calcium signals in suspension as previously described (Vergnolle et al., 1998). Cells were rinsed and disaggregated using isotonic calcium-free phosphate buffered saline (for HEK cells) or cell dissociation buffer (for KNRK-PAR₂ cells – Gibco) and, after centrifugation, were resuspended in 1 ml of DMEM in the presence of the calcium indicator, Fluo-3 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at a final concentration of $25 \,\mu g \,\mathrm{ml}^{-1}$ (22 μM). Cells were allowed to take up Fluo-3 for 25 min at room temperature, in the presence of 0.25 mM sulfinpyrazone, after which time the cells were rinsed twice by centrifugation and resuspended in buffer (in mM: NaCl, 150; KCl, 3; CaCl, 1.5; HEPES, 20; glucose, 10; sulfinpyrazone, 0.25) to remove excess dye. Cell concentrations of approximately $6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ was used for fluorescence studies. Fluorescence measurements, reflecting elevations of intracellular calcium, were conducted at 24°C, using a Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer, with an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength recorded at 530 nm. Cells were maintained in suspension in a stirred (round magnetic flea-bar) plastic cuvette (total volume 2 ml) maintained at 24°C, and peptide (SLIGRL 50 μ M 2 ml⁻¹) or tryps in (1 U 2 ml⁻¹) stock solutions were added directly to the suspension.

Dorsal root ganglia neuron cultures and calcium imaging

Dorsal root ganglia (DRG) neurons from thoracic and lumbar spinal cord of mice were minced in cold Hank's balanced salt solution (HBSS - Sigma) and incubated for 90 min at 37°C in DMEM (low glucose – Sigma) containing (in $mg ml^{-1}$): 0.5 trypsin, 1.0 collagenase type I and 0.1 DNase type A (Sigma) (Steinhoff et al., 2000). SBTI (Sigma) was added to neutralize trypsin. Neurons were centrifuged, pellets were suspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 10% horse serum, 1% PSS, glutamine (2 mMml^{-1}) and $2.5 \,\mu\text{g}\,\text{ml}^{-1}$ DNAse type IV and plated on glass coverslips Petri dishes (35 mm diameter; MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) coated with Matrigel (BD Biosciences, Belford, MA, USA). Cells were cultured for a minimum of 72 h. The Petri dishes were then washed twice with a Hanks buffered salt solution, pH 7.4 and incubated for 60 min at 37°C with Hanks buffered salt solution supplemented with 0.1% bovine serum albumin in the same solution to which 3–5 μ M of Fluo-3-AM was added. After the incubation period, the Petri dishes were washed twice again with the assay buffer (the same as described above) of which 2 ml were left in each Petri dish.

Cells were observed using a wide-field fluorescence Olympus IX-70 microscope and an LCPlan FL × 40 objective. The time course of changes was studied in a series of 30 pictures taken over 90 s; the five initial pictures were used to determine the baseline. Before the fifth picture, neurons were treated by an acute administration of SLIGRL (100μ M), trypsin (2.5 Uml^{-1}), capsaicin (100 nM), bradykinin (10 nM) and/or mS100A9p (0.5, 5, 50 or 100μ M 2 ml^{-1}). The experiment was repeated three times per group. Fluorescence measurements reflecting elevations of intracellular calcium were conducted at 460–490 nm excitation and 515 nm emission in individual cells using the acquisition program OpenLab software.

Substance P secretion

DRG neurons isolated from mice were rinsed in HBSS, and incubated in HBSS containing 1% Papain (Worthington, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) for 10 min at 37°C. After a wash with filtered Leibovitz's L-15 Medium solution (glutamine (200 mM), glucose 20%, FBS 10%), DRG neurons were incubated in HBSS containing collagenase (1 mg ml^{-1}) and dispase (4 mg ml^{-1}) at 37°C for 10 min. After titration, cells were plated in Poly-L-ornithine-laminine (Sigma) glassbottom Petri dishes (35 mm diameter; MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) and recovered with the complete culture media MEM, 2.5% FBS, 1% penicillin/streptomycin, glutamine (200 mM), 1% dextrose and cytosine- β -D-arabinofuranoside hydrochloride, 5-fluoro-2-deoxi-uridine, uridine $10\,\mu\text{M}$ each). Cells were incubated at 37°C for 5-min with HBSS alone (200 μ l) or HBSS containing LRGILS 100 μ M, SLIGRL 100 μ M, mS100A9 100 μ M or SLIGRL 100 μ M plus mS100A9 100 μ M. Cell supernatants were assayed for substance P (SP) using an enzymatic immunoassay kit (Assay Design, Ann Arbor, MI, USA) following the manufacturer's recommendations.

Presentation of data and analysis

All data are presented as the mean \pm s.e.m. Statistical analysis of data were generated using GraphPAd Prism, version 4.02 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical analysis between two samples was performed using Student's *t*-test. Statistical comparison of more than two groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post-test. In all cases, values of *P*<0.05 were considered statistically significant.

Chemicals

The peptide identical to the C-terminus of murine S100A9 protein – H-E-K-L-H-E-N-N-P-R-G-H-G-H-S-H-G-K-G-NH₂ (mS100A9p) – was synthesized based on the sequence published by Raftery *et al.* (1996). This peptide was synthesized in solid phase by fluorenil-metoxicarbonil (FMOC) technique. Characterization and purification were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and its mass evaluated by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) spectrometry. The peptide was diluted in saline at a final concentration of 1 mg ml⁻¹.

PAR agonists. The peptide corresponding to the tethered ligand domain of PAR₂ (S-L-I-G-R-L-NH₂) and the control peptide (L-R-G-I-L-S-NH₂) were purchased from EZbiolab Inc. (Westfield, IN, USA). Trypsin from porcine pancreas (10 200 U mg⁻¹), trypsin inhibitor (SBTI), capsaicin and bradykinin were purchased from Sigma (St Louis, USA). Trypsin, SLIGRL-NH₂, capsaicin and bradykinin were diluted in saline (0.9% NaCl).

Results

Effect of mS100A9p on trypsin-induced hyperalgesia

Rats received an i.pl. injection of trypsin at a dose of $50 \mu g$, concomitantly with 1 or $4 \mu g$ of mS100A9p. Nociceptive threshold (in grams) in response to mechanical stimulus was measured before and after i.pl. injections. i.pl. injection of trypsin caused a decreased nociceptive threshold characteristic of hyperalgesia, and coinjection with mS100A9p inhibited trypsin-induced hyperalgesia (see Figure 1). Both doses of mS100A9p tested (1 and $4 \mu g$) were effective at reducing trypsin-induced hyperalgesia (Figure 1).

We further investigated whether or not the inhibitory effect of mS100A9p on trypsin-induced hyperalgesia could be caused by inhibition of trypsin proteolytic activity. The effect of mS100A9p on trypsin enzymatic activity was evaluated by following the hydrolysis of the chromogenic substrate BAPNA at 405 nm. Enzymatic activity of trypsin incubated in the presence of mS100A9p (1 or 4 μ g) for 30 min was not reduced compared to the activity of trypsin used alone (see Table 1). In contrast, incubation of trypsin with SBTI (50 μ g) completely inhibited trypsin activity (Table 1).



Figure 1 Effects of mS100A9p on mechanical hyperalgesia induced by trypsin in rats. Trypsin (50 μ g) was incubated for 30 min at 37°C with 1 or 4 μ g of mS100A9p and the combination was then injected into the rat paw. Pain threshold in response to mechanical stimulation was measured in rats before (basal measurement) and 1 h after treatment using the paw pressure test. Rats injected with saline or trypsin alone were submitted to the same protocol. Data represent mean \pm s.e.m. of 6–8 animals per group. (*) Significantly different from basal measurements (P<0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test).

Table 1 Effect of mS100A9p on the enzymatic activity of trypsin

| Experimental groups | Absorbance at 405 nm | |
|---|----------------------|--|
| Control group (Tris HCl buffer) | 0 | |
| Trypsin 50 μ g | 0.833 (±0.094) | |
| Trypsin 50 μ g + mS100A9p 1 μ g | 0.550 (±0.116) | |
| Trypsin 50 μ g + mS100A9p 4 μ g | 0.646 (±0.074) | |
| Trypsin 50 μ g + SBTI 50 μ g | 0 | |
| SBTI 50 μg | 0 | |
| mS100A9p 4μg | 0 | |

The catalytic activity of trypsin was measured with the chromogenic substrate, BAPNA; incubation conditions are described in the Materials and methods. Preincubation of trypsin with mS100A9p (either 1 or 4 μ g) did not significantly affect the increase of absorbance at 405 nm, demonstrating no change in the catalytic activity of trypsin.

Taken together, these results suggest that mS100A9p does not reduce trypsin-induced hyperalgesia by inhibiting trypsin enzymatic activity.

Effect of mS100A9p on PAR₂-activating peptide-induced hyperalgesia

Because trypsin causes inflammation and pain by acting on PAR₂ (Vergnolle *et al.*, 2001a, Nguyen *et al.*, 2003), we tested the effects of mS100A9p on selective PAR₂ agonist-induced hyperalgesia. Rats received an i.pl. injection of the selective PAR₂ agonist SLIGRL-NH₂ at a dose of $10 \,\mu g$, concomitantly with 1, 4 or $8 \,\mu g$ of mS100A9p. Nociceptive threshold (in grams) and withdrawal latency (in seconds) in response to

mechanical and thermal stimulus, respectively, were measured before and after i.pl. injections. Administration of SLIGRL-NH₂ caused a significant decrease of the nociceptive threshold (Figure 2) and withdrawal latency (Figure 3),



Figure 2 Effects of time of treatment with mS100A9p on mechanical nociception in rats induced by SLIGRL-NH₂. The mS100A9p was given in doses of 1, 4 or 8 μ g concomitantly (**a**), 30 min before (**b**) or 1 h after (**c**) i.pl. injection of 10 μ g of SLIGRL-NH₂. Animals were evaluated before (time 0), 1, 2, 3 and 4 h after treatment. Rats injected only with SLIGRL-NH₂ received the same total volume as the other groups. Data represent mean \pm s.e.m. of 6–8 animals per group. (*) Significantly different from SLIGRL-NH₂ alone at the same time-point (*P*<0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test).



Figure 3 Effects of time of treatment with mS100A9p on thermal nociception in rats, induced by SLIGRL-NH₂. The mS100A9p was given in doses of 0.1, 1 or 20 μ g concomitantly (**a**), 30-min before (**b**) or 1-h after (**c**) i.pl. injection of 10 μ g of SLIGRL-NH₂. Animals were evaluated before (time 0), 1, 2 and 3 h after SLIGRL-NH₂ administration. Rats injected only with SLIGRL-NH₂ received the same total volume as the other groups. Data represent mean±s.e.m. of eight animals per group. (*) Significantly different from SLIGRL-NH₂ alone at the same time-point (*P*<0.05), (**) significantly different from SLIGRL-NH₂ alone at the same time-point (*P*<0.001), one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison posttest).

characteristic of mechanical and thermal hyperalgesia, respectively. Concomitant administration of mS100A9p inhibited SLIGRL-induced mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner (Figure 2a), with the lowest dose $(1 \mu g)$ inhibiting hyperalgesia only at the first hour and by 45%, but the two higher doses (4 and $8 \mu g$) reduced hyperalgesia from 1 to 3 h, and by 59 and 81%, respectively, at 3-h. Pretreatment (30 min before) with mS100A9p also significantly reduced SLIGRL-induced mechanical hyperalgesia (Figure 2b). Here again, the effect of mS100A9p was dose-dependent, as the dose of $1 \mu g$ of mS100A9p inhibited hyperalgesia by 45 and 48% at the first and second hours of evaluation, the dose of $4\mu g$ of mS100A9p, inhibited hyperalgesia by 67% at the first hour, 97% at the second hour and 65% at the third hour, and the dose of $8 \mu g$ mS100A9p inhibited SLIGRL-induced hyperalgesia by 60% at the first hour, 100% at the second hour and by 50% at the third hour of evaluation. In contrast, post-treatment with mS100A9p (1h after SLIGRL) did not modify SLIGRLinduced mechanical hyperalgesia at the two doses tested (1 and $4 \mu g$) (Figure 2c).

Similarly to mechanical stimuli, SLIGRL-induced thermal hyperalgesia was significantly reduced by concomitant i.pl. administration of mS100A9p (Figure 3a). The three doses tested (0.1, 1 and $20 \mu g$) of mS100A9p inhibited SLIGRL-induced thermal hyperalgesia for the first 2-h, with the

percentage inhibition ranging from 15 to 100%. Pretreatment with mS100A9p 30-min before i.pl. SLIGRL also caused inhibition of thermal hyperalgesia, but only for the two highest doses and only for the first hour (Figure 3b). As observed for mechanical hyperalgesia, post-treatment with mS100A9p, even at the two highest doses (1 and $20 \mu g$; Figure 3c) did not significantly reduce SLIGRL-induced hyperalgesia.

Activation of spinal nociceptors

Previous reports showed that i.pl. injection of SLIGRL enhanced *c-fos* expression in the superficial laminae of the dorsal horn of the spinal cord of rats (Vergnolle *et al.*, 2001b). Here, we evaluated the effects of i.pl. administration of SLIGRL on expression of Egr-1, a marker of nociceptor activation similar to the Fos protein, in the presence or absence of mS100A9p. i.pl. injection of $10 \,\mu g$ of SLIGRL increased Egr-1 expression (56%) at the superficial laminae of the spinal dorsal horn, 3 h after the injection (Figure 4). Concomitant treatment with $4 \,\mu g$ of mS100A9p significantly inhibited the number of Egr-1 immunolabeled nuclei in the superficial laminae of the dorsal horn, while mS100A9p alone had no effect on the number of immunolabeled nuclei in basal conditions (Figure 4; n = 6).



Figure 4 Effects of saline, mS100A9p, SLIGRL-NH₂ or SLIGRL-NH₂ plus mS100A9p on dorsal horn expression of Egr-1. (**a**–**e**) Photomicrographs of immunostained sections of spinal cord dorsal horn from (**a**) naïve (control) animals, or from rats after i.pl. injection of: (**b**) saline; (**c**) 4 μ g mS100A9p; (**d**) 10 μ g SLIGRL-NH₂; (**e**) concomitant treatment with SLIGRL-NH₂ and mS100A9p. (**f**) quantitative changes in Egr-1 immunoreactivity in dorsal horn (L4 and L5) of rats. The spinal cords were collected 3 h after the treatments. Scale bar = 50 μ m. Data represent mean \pm s.e.m. of six animals per group. (*) Significantly different from all other groups (*P*<0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test).

Effects of mS100A9p on calcium mobilization in sensory neurons PAR₂ is expressed and causes calcium influx in sensory neurons from DRG cultures (Steinhoff et al., 2000). We first wanted to investigate whether or not mS100A9p could interfere with PAR₂ signaling in DRG neurons. Neurons were stimulated with two PAR₂ agonists: trypsin (2.5 Uml^{-1}) , Figure 5a) or SLIGRL (100 μ M, Figure 5b), concomitantly with mS100A9p at the concentrations of 0.5, 5, 50 or $100 \,\mu$ M. All the doses of mS100A9p tested, significantly inhibited the magnitude of calcium flux in DRG neurons in response to trypsin (2.5 Uml^{-1}) , and this effect was dose-dependent (Figure 5a). mS100A9p also inhibited the SLIGRL-induced calcium influx at the concentrations of $5 \,\mu M$ (11%), $50 \,\mu M$ (13%) and 100 μ M (9%; Figure 5b). Next, we wanted to investigate whether mS100A9p was able to interfere with the signaling of other pronociceptive substances on sensory neurons. Therefore, isolated DRG neurons were stimulated by capsaicin (Figure 5c) or by bradykinin (Figure 5d), and the effects of different concentrations of mS100A9p on calcium mobilization were recorded. Capsaicin-induced calcium mobilization in DRG neurons was inhibited by 50 and $100 \,\mu\text{M}$ of mS100A9p (15 and 14%, respectively), but not by 0.5 or $5 \mu M$ (Figure 5c). Finally, $50 \mu M$ but not $5 \mu M$ of mS100A9p inhibited bradykinin-induced calcium mobilization in sensory neurons (10% inhibition; Figure 5d).

Effects of mS100A9p on PAR_2 -induced SP release by sensory neurons

PAR₂ activation on sensory neurons causes SP release (Steinhoff *et al.*, 2000). We wanted to investigate whether or not mS100A9p was able to also inhibit PAR₂-induced SP release. As previously described, incubation of sensory neurons in the presence of the PAR₂ agonist SLIGRL-NH₂ (100 μ M) caused a significant increase in SP release compared to the effects of the control peptide inactive on PAR₂ LRGILS-NH₂ (Figure 6). mS100A9p (50 μ M) was able to completely inhibit the effects of PAR₂ agonist on SP release stimulated by the agonist peptide, while it had no effect on SP release from DRG neurons exposed to mS100A9p alone (Figure 6).

mS100A9p effect on PAR_2 activation is specific for sensory neurons

As mS100A9p was able to significantly inhibit PAR₂-induced hyperalgesia and PAR₂-induced calcium signal in sensory neurons, we wanted to investigate whether or not mS100A9p could act as a PAR₂ antagonist. Therefore, we used HEK cells naturally expressing PAR₂, and KNRK cells stably transfected with PAR₂, or untransfected cells and evaluated the effects of mS100A9p on calcium flux. In HEK cells, the response to trypsin (5 U ml⁻¹) was not modified by concomitant or pre-



Figure 5 Effect of mS100A9p on calcium flux in DRG neurons. Neurons were exposed to SLIGRL (100μ M; (**a**)), trypsin (5 U ml^{-1} ; (**b**)), capsaicin (100 nM; (**c**)) or bradykinin (10 nM; (**d**)) and concomitantly to mS100A9p ($0.5 5, 50 \text{ or } 100 \mu$ M). Neurons exposed only to SLIGRL, trypsin, capsaicin or bradykinin were considered as control groups. Calcium flux was measured by fluorescence (460-490 nm excitation and 515 nm emission) in individual cells using a Wide-Field Fluorescence Microscope. Kinetic studies of 30 pictures in 90 s were performed. Data represent mean \pm s.e.m. of 15–20 neurons per group. (*) Significantly different from control groups (P < 0.05), (**) significantly different from control groups (P < 0.001, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test).



Figure 6 Effects of vehicle, LRGILS-NH₂, SLIGRL-NH₂, mS100A9p or SLIGRL-NH₂ plus mS100A9p on SP release by cultured DRG neurons. Data represent mean \pm s.e.m. of 15–20 neurons per group. (**) Significantly different from vehicle pr LRGILS-NH₂ (*P*<0.001), (ψ) significantly different from SLIGRL-NH₂ alone (*P*<0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post-test).

exposure of cells to $50 \,\mu\text{M}$ of mS100A9p (Figure 7a). Similarly, response of those cells to the selective PAR₂ agonist SLIGRL-NH₂ was not modified by mS100A9p (Figure 7b). KNRK nontransfected cells did not respond to trypsin or the selective PAR₂ agonist SLIGRL-NH₂ (data not shown). In contrast, KNRK PAR₂-transfected cells showed calcium mobilization in response to trypsin ($5 \,\text{Uml}^{-1}$) or SLIGRL-NH₂ ($5 \,\mu\text{M}$), but the amplitude of those responses was not modified by concomitant, or pre-exposure to mS100A9p (Figure 8).

Discussion

Antinociceptive properties for S100A9 protein have been demonstrated in different models of inflammatory pain, where this protein inhibited hyperalgesia and nociception (Giorgi et al., 1998; Pagano et al., 2002). However, antiinflammatory effects are also associated with the C-terminus of S100A9. Murine S100A9 C-terminal peptide (mS100A9p) inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells (Pagano et al., 2005). Also, mS100A9p inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin, a metalloproteinase, through inhibition of its enzymatic activity (Dale et al., 2004). Therefore, it was not clear whether the analgesic properties of mS100A9p were due to inhibition of different proinflammatory parameters, which would then lead to a reduction of inflammatory hyperalgesia, or whether mS100A9p could exert a direct inhibitory effect on inflammatory pain. As serine proteases, and the receptors they activate, the protease-activated receptors (PARs), have been shown to play a pivotal role in pain transmission, independently of their effects on inflammation (Hoogerwerf et al., 2001; Vergnolle et al., 2001a, 2003; Ossovskaya and Bunnett 2004), we wanted to investigate the effects of the C-terminal fragment of the S100A9 protein

S100A9 inhibits PAR₂-induced pain CS Dale *et al*



Figure 7 Effect of mS100A9p on calcium signaling in HEK-293 cells. (a) Cells were activated by the exposure to 5 U of trypsin alone or by trypsin plus 50 μ M of mS100A9p. Trypsin and mS100A9p were incubated either 10 min before cell exposure or at the same time (b). Cells were activated by the exposure to 50 μ M of SLIGRL-NH₂ alone or by SLIGRL-NH₂ plus 50 μ M of mS100A9p. SLIGRL-NH₂ and mS100A9p were incubated either 10 min before cell exposure or at the same time. Cells were monitored for fluorescence and the response to mS100A9p treatment was compared to the response of cells exposed only to the agonists (trypsin or SLIGRL-NH₂). The data are illustrative of four or more independently conducted experiments.

SLIGRL (50µM)

(mS100A9p) on the hyperalgesia induced by trypsin and by a selective PAR_2 agonist.

We found that mS100A9p inhibited hyperalgesia induced by trypsin in rats, evaluated by the paw pressure test. This effect was not dependent on an inhibitory action of the peptide upon trypsin enzymatic activity, since mS100A9p did not inhibit trypsin catalytic activity. These results suggested that the effects of mS100A9p on trypsin-induced hyperalgesia were not due to inhibition of serine protease activity released at the inflammatory site. The antihyperalgesic effects of the peptide were also observed with hyperalgesia induced by the PAR₂ agonist peptide SLIGRL-NH₂. Previous studies have demonstrated, and we have confirmed in our study (data not shown), that at the dose of SLIGRL-NH₂ we used (10 μ g per rat paw), no inflammatory reaction was observed – no edema, no vasodilatation, no



Figure 8 Effect of mS100A9p on calcium signaling in KNRK-PAR₂ cells. (a) Cells were activated by the exposure to 1 U of trypsin alone or by trypsin plus 50 μ M of mS100A9p. Trypsin and mS100A9p were incubated either 10 min before cell exposure or at the same time (b). Cells were activated by the exposure to 50 μ M of SLIGRL-NH₂ alone or by SLIGRL-NH₂ plus 50 μ M of mS100A9p. SLIGRL-NH₂ and mS100A9p were incubated either 10 min before cell exposure or at the same time. Cells were monitored for fluorescence and the response to mS100A9p treatment was compared to the response of cells exposed only to the agonists (trypsin or SLIGRL-NH₂). The data are illustrative of four or more independently conducted experiments.

increase in prostaglandin release and no granulocyte infiltration (Vergnolle *et al.*, 2001a). Therefore, the antinociceptive effects of mS100A9p do not seem to be related to its potential anti-inflammatory effects, but rather to the possibility that mS100A9p could act directly on the pathways that relay nociceptive messages.

mS100A9p not only significantly inhibited PAR₂-induced hyperalgesia in rats submitted either to mechanical or to thermal nociceptive tests, but also decreased nociceptor activation at the spinal level. The expression of protooncogenes from the *c-fos, c-jun* and *egr-1* family are extensively used as tools for the expression of enhanced activity of nociceptive neurons (Herdegen *et al.*, 1991; Buritova *et al.*, 1995). Our results demonstrated that the i.pl. administration of SLIGRL-NH₂ induced a significant increase of Egr-1 expression, which is characteristic of nociceptor activation. This result is in accordance with previously published data showing that Fos protein expression was increased in the nuclei of neurons of the spinal dorsal horn, in response to i.pl. PAR₂ agonist (Vergnolle *et al.*, 2001a). Interestingly, we showed here that mS100A9p is able to interfere with the transmission of PAR₂-induced pain message to the central nervous system, reducing nociceptor activation at a central level. Moreover, we showed that mS100A9p can act directly on sensory neuron activation, inhibiting PAR₂-, bradykinin-, and capsaicin-induced calcium mobilization in DRG neurons. This result reveals sensory neurons as another important cellular target for the effects of S100A9 protein in the context of inflammation and also suggests an antinociceptive role for S100A9 independent of its effects on inflammation.

As proteases are largely released at sites of inflammation and as they have been demonstrated to be able to signal directly to sensory neurons through the activation of PAR₂, causing sensitization and ultimately pain signals (Hoogerwerf et al., 2001; Vergnolle et al., 2001a; Kirkup et al., 2003; Reed et al., 2003), it was possible that mS100A9p acted as a PAR₂ antagonist to reduce the transmission of pain signals. We tested this hypothesis by investigating the effects of mS100A9p in cells, other than sensory neurons, that express PAR₂. We showed that mS100A9p, at a dose (50 μ M) that showed maximal effect in DRG neurons against PAR₂ agonists, was not able to modify the amplitude of the calcium response of HEK cells naturally expressing PAR₂, or of PAR₂-transfected KNRK cells to trypsin or SLIGRL-NH₂. This result suggests that mS100A9p did not act as a direct antagonist on PAR₂. One explanation could also be that signaling pathways involved in calcium mobilization are different in DRG neurons and HEK or KNRK-transfected cells. mS100A9p could antagonize signaling pathways and calcium mobilization downstream from PAR₂ activation. The fact that calcium mobilization in DRG neurons induced by three different agonists, capsaicin, bradykinin and the PAR₂ agonist, was inhibited by mS100A9p suggested that mS100A9p acted on a process common to these activators of sensory neurons. Importantly, our results showed a doseresponse effect for the antinociceptive properties and inhibition of calcium mobilization of mS100A9p, against PAR₂ agonists. As mS100A9p inhibits calcium mobilization in response to the activation of three different receptors: bradykinin B2 receptor, transient receptor potential vanillin -1 (TRPV1: activated by capsaicin in DRG neurons) or PAR₂, one hypothesis could be that mS100A9p blocks a calcium channel present on sensory neurons and common to the signaling pathway of those three receptors. A more definitive understanding of the mechanism of action of \$100A9 on inflammatory and nociceptive mediator biology represents the next challenge in this field.

We found that mS100A9p inhibits PAR₂-induced SP release in cultured DRG neurons. Considering the pivotal role played by SP in the transmission of nociceptive message (Harrison and Geppetti, 2001), our results suggest that the analgesic properties of mS100A9p *in vivo*, could be due to such inhibition of SP release, thus preventing further activation of pain pathways.

In conclusion, our data has presented evidence that the C-terminal of the S100A9 protein exhibits antinociceptive

which are thus highlighted as important cellular targets of the effects of \$100A9. Our data reinforce the potential prominent role that \$100A9 could play in the control of inflammatory pain.

Acknowledgements

This study was part of the PhD thesis of Camila Squarzoni Dale, carried out at the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Program of Experimental and Comparative Pathology. We thank Dr Morley Hollenberg, from the Department of Pharmacology and Therapeutics of University of Calgary, for the use of the fluorescence spectrophotometer and Dr Pina Colarusso from the Department of Physiology & Biophysics for the use of the fluorescence microscope. We also thank Dr Luis Roberto de Carmargo Gonçalves from the Laboratory of Pathophysiology of Butantan Institute for the chromogenic substrate and Adilson da Silva from the Department of Physiology and Biophysics of the Institute of Biomedical Sciences for technical support. This work was supported by CAPES, FAPESP and the Canadian Institute for Health Research.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Aguiar-Passeti T, Postol E, Sorg C, Mariano M (1997). Epithelioid cells from foreign-body granuloma selectively express the calciumbinding protein MRP-14, a novel down-regulatory molecule of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **62**: 852–858.
- Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A *et al.* (1996). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* **14**: 1009–1016.
- Buritova J, Honore P, Besson JM (1995). Indomethacin reduces both Krox-24 expression in the rat lumbar spinal cord and inflammatory signs following intraplantar carrageenan. *Brain Res* **674**: 211–220.
- Brun JG, Haland G, Haga HJ, Fagerhol MK, Jonsson R (1995). Effects of calprotectin in avridine-induced arthritis. *APMIS* **103**: 233–240.
- Brun JG, Jonsson R, Haga HJ (1994). Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol* **21**: 733–738.
- Dale CS, Goncalves LRC, Juliano L, Juliano MA, Moura-da-Silva AM, Giorgi R (2004). The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. *Peptides* **25**: 81–89.
- Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, Freemont P, Hogg N (1991). Identification of p8, 14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J Biol Chem* **266**: 7706–7713.
- Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J (2004). Phagocyte-specific calciumbinding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta* **344**: 37–51.
- Giorgi R, Pagano RL, Dias MA, Aguiar-Passeti T, Sorg C, Mariano M (1998). Antinociceptive effect of the calcium-binding protein

MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. *J Leukoc Biol* 64: 214–220.

- Golden BE, Clohessy PA, Russell G, Fagerhol MK (1996). Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* **74**: 136–139.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**: 77–88.
- Harrison S, Geppetti P (2001). Substance P. Int J Biochem Cell Biol 33: 555–576.
- Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N (1993). MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca (2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol* 53: 197–204.
- Herdegen T, Kovary K, Leah J, Bravo R (1991). Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol* **313**: 178–191.
- Hollenberg MD, Saifeddine M, Al-Ani B, Kawabata A (1997). Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptoractivating peptides. *Can J Physiol Pharmacol* **75**: 832–841.
- Hogg N, Allen C, Edgeworth J (1989). Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8, 14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *Eur J Immunol* **9**: 1053–1061.
- Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, Sun D, Micci MA, Lee-Hellmich H et al. (2001). The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. J Neurosci 21: 9036–9042.
- Kirkup AJ, Jiang W, Bunnett NW, Grundy D (2003). Stimulation of proteinase-activated receptor 2 excites jejunal afferent nerves in anaesthetised rats. *J Physiol* **552**: 589–601.
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 9208–9212.
- Nguyen C, Coelho AM, Grady E, Compton SJ, Wallace JL, Hollenberg MD *et al.* (2003). Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 920–927.
- Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84: 579–621.
- Pagano RL, Dias MA, Dale CS, Giorgi R (2002). Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators Inflamm* **11**: 203–210.
- Pagano RL, Sampaio SC, Juliano L, Juliano MA, Giorgi R (2005). The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells. *Inflamm Res* 54: 204–210.
- Randall LO, Selitto JJ (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**: 409–419.
- Raftery MJ, Harrison CA, Alewood P, Jones A, Geczy CL (1996). Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14kDa migrationinhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. *Biochem J* **316**: 285–293.
- Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF *et al.* (2003). Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 547: 531–542.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* **170**: 3233–3242.
- Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW (1995). Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* **25**: 638–643.
- Sorg C (1992). The calcium binding proteins MRP8 and MRP14 in acute and chronic inflammation. *Behring Inst Mitt* **91**: 126–137.
- Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK (1990). Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* **336**: 763–765.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS *et al.* (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6: 151–158.

- Striz I, Trebichavsky I (2004). Calprotectin –a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* **53**: 245–253.
- Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA (2003). Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **171**: 2602–2609.
- Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF *et al.* (2001a). Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. *Nat Med* **7**: 821–826.
- Vergnolle N, Ferazzini M, D'andrea MR, Buddenkotte J, Steinhoff M (2003). Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci* 26: 496–500.
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL (1999). Characterization of the inflammatory response to proteinaseactivated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol* **127**: 1083–1090.
- Vergnolle N, Macnaughton WK, Al-Ani B, Saifeddine M, Wallace JL, Hollenberg MD (1998). Proteinase-activated receptor 2 (PAR₂)activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR₂ that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 7766–7771.
- Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD (2001b). Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci* 22: 146–152.
- Yui S, Mikami M, Tsurumaki K, Yamazaki M (1997). Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *J Leukoc Biol* **61**: 50–57.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* **37**: 417–429.

Soluções utilizadas_

Anexos

Soluções utilizadas_____

Soluções utilizadas

1)Tampão fosfato salina PBS

Solução estoque - 10 x concentrada - pH 7.4

| Na ₂ HPO ₄ | 81mM |
|----------------------------------|---------|
| NaH ₂ PO ₄ | 19mM |
| NaCl | 1,54mM |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

2)Tampão PB 0,1M

| Na ₂ HPO ₄ | 6,25 g |
|----------------------------------|---------|
| NaH ₂ PO ₄ | 22g |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

3)Paraformaldeído (PFA) 4%

| Paraformaldeído | 40g |
|----------------------------|---------|
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

Preparar utilizando a água aquecida e filtrar. Deve estar gelado no momento do uso

4)Tampão de corrida de cálcio HEPES

Solução estoque – pH 7.4 – manter à 4°C

| NaCl | 150 mM |
|----------|--------|
| HEPES | 20 mM |
| Dextrose | 10 mM |

| KCl | 3 mM |
|----------------------------|---------|
| Sulfinpyrazone | 250 µM |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

Solução de cálcio

| CaCl ₂ | 280 mM |
|----------------------------|--------|
| H ₂ O destilada | 100 mL |

Para o tampão de corrida de cálcio adicionar 540 µL da solução de cálcio a 100 mL de solução estoque. Preparar tampão de corrida imediatamente antes do uso.

5)HBSS sem cálcio e magnésio

Solução 10 x concentrada

| NaCl | 1,37 M |
|---------------------------------|---------|
| NaHCO ₃ | 0,042 M |
| Dextrose | 0,056 M |
| KCl | 0,054 M |
| KH ₂ PO ₄ | 4,41 mM |
| Na ₂ PO ₄ | 1,79 mM |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |

6)Meio DMEM

Para células HEK-293

DMEM

1 envelope

| H ₂ O destilada | 1000 mL |
|----------------------------|---------|
| soro fetal bovino | 10% |
| PSS | 1% |
| Piruvato de sódio | 1% |

Para células KNRK

| DMEM | 1 envelope |
|----------------------------|------------|
| Bicarbonato de sódio | 2 g |
| H ₂ O destilada | 1000 mL |
| soro fetal bovino | 10% |
| PSS | 1% |
| Piruvato de sódio | 1% |
| geneticina | 1% |

7) Meio Leibovitz L15

| L15 | 1 envelope |
|----------------------------|------------|
| H ₂ O destilada | 1000 mL |
| glutamina | 200 mM |
| glicose | 20% |
| soro fetal bovino | 10% |

8) Meio MEM

| MEM | 1 envelope |
|----------------------------|------------|
| H ₂ O destilada | 1000 mL |
| Bicarbonato de sódio | 2g |
| Soro fetal bovino | 2.5% |
| PSS | 1% |
| glutamina | 200 mM |
| dextrose | 1% |
| ARAC | 10 µM |
| FUDR | 10 µM |
| uridina | 10 µM |
| | |

9) Tampão de gravação

| H ₂ 0 destilada | 1000 mL |
|----------------------------|---------|
| CaCl2 | 2 mM |
| HEPES | 10 mM |
| TEACI | 160 mM |
| glicose | 10 mM |

10) Tampão de corrida para correntes de alta voltagem em células HEK-tsA trasfectadas

| H ₂ O destilada | 1000 mL |
|----------------------------|---------|
| BaCl ₂ | 20 mM |

| MgCl ₂ | 1mM |
|-------------------|-------|
| HEPES | 10 mM |
| TEACI | 40 mM |
| glicose | 10 mM |
| CsCl | 65mM |

11) Tampão de corrida para correntes de baixa voltagem em células HEK-tsA trasfectadas

| H ₂ O destilada | 1000 mL |
|----------------------------|---------|
| BaCl ₂ | 2 mM |
| MgCl ₂ | 1mM |
| HEPES | 10 mM |
| TEACI | 40 mM |
| glicose | 10 mM |
| CsCl | 105mM |

12) Solução interna para preenchimento das pipetas de borosilicato

Para neurônios DRG (pH7.2)

| H ₂ O destilada | 1000 mL |
|----------------------------|---------|
| CsCl | 110 mM |
| MgCl ₂ | 3 mM |
| EGTA | 10 mM |

| HEPES | 10 mM |
|-------|--------|
| MgATP | 3 mM |
| GTP | 0,6 mM |

| Para céluas HEK tsA (pH 7.2) | |
|------------------------------|---------|
| H ₂ O destilada | 1000 mL |
| CsMeSO4 | 108 mM |
| MgCl ₂ | 4 mM |
| EGTA | 9 mM |
| HEPES | 9 mM |
| MgATP | 2,6 mM |
| Ligtp | 0,6 mM |