

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**ELIZABETH TING**

**O PAPEL DO COMPLEMENTO C5a NA HIPERNOCICEPÇÃO  
MECÂNICA INFLAMATÓRIA: O POTENCIAL DO USO DE  
ANTAGONISTAS DO RECEPTOR C5a PARA O CONTROLE  
DA DOR INFLAMATÓRIA**

**RIBEIRÃO PRETO**  
**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ELIZABETH TING**

**O PAPEL DO COMPLEMENTO C5a NA HIPERNOCICEPÇÃO  
MECÂNICA INFLAMATÓRIA: O POTENCIAL DO USO DE  
ANTAGONISTAS DO RECEPTOR C5a PARA O CONTROLE  
DA DOR INFLAMATÓRIA**

Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

**Orientador:**

**Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**

**Co-Orientador:**

**Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Ting, Elizabeth

O papel do complemento C5a na hipernocicepção mecânica inflamatória: o potencial do uso de antagonistas do receptor C5a para o controle da dor inflamatória/ Elizabeth Ting; Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira; Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha – Ribeirão Preto, 2008.

92 p.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. dor inflamatória. 2. hipernocicepção. 3. C5a. 4. sistema complemento. 5. neutrófilos. 6. citocinas.



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Elizabeth Ting**

**O Papel do Complemento C5a na Hipernocicepção Mecânica Inflamatória: o Potencial do Uso de Antagonistas do Receptor C5a para o Controle da Dor Inflamatória**

**Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.**

**Aprovada em: 15 de Maio de 2008.**

### BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**

**Instituição: FMRP/USP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira**

**Instituição: ICB/UFMG**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof.a Dr.a Lêda Menescal de Oliveira**

**Instituição: FMRP/USP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. Giles Alexander Rae**

**Instituição: CCB/UFSC**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**

**Instituição: FORP/USP**

**Assinatura: \_\_\_\_\_**

## ***AGRADECIMENTOS***

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos seus sábios ensinamentos tanto em como fazer uma ciência limpa e completa, bem como nos diversos assuntos da vida e cultura. Agradeço também ao seu acolhimento e compreensão em tantos momentos difíceis da minha estada em Ribeirão Preto, obrigada por ser meu mestre, chefe e muitas vezes um pai quase avô! Agradeço também a **Profa. Dra. Maria Clotilde Therezinha Rossetti Ferreira (Tilde)** que sempre me recebeu com carinho em sua casa.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, pela decisiva co-orientação, o qual foi imprescindível para o andamento acelerado deste trabalho, já que o projeto anterior havia consumido mais de um terço do tempo dado pelo programa. Além disso, o seu modo de pensar e de fazer ciência me ensinou que a pesquisa também existe um lado prático e simples.

Ao **Prof. Dr. Giles Alexander Rae**, por aceitar a fazer parte da comissão julgadora desta tese e por se dispor a realizar uma correção minuciosa e colocar estas sugestões na pró-forma cujas colocações foram essenciais para a melhoria da apresentação deste trabalho. Confesso que fiquei surpresa e imensamente agradecida!

À **Profa. Dra. Lêda Menescal de Oliveira** e ao **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**, por aceitarem a compor a comissão julgadora desta tese e também de se disporem os seus valiosos e corridos horários para uma prévia discussão da tese e sugerirem as correções da pró-forma, muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira**, por aceitar a participar da comissão julgadora desta tese e por ter sido tão acessível (por e-mail) para responder às remarcações das datas...

Aos professores do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em especial ao **Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado**, pela gentileza de sempre dispor o seu laboratório e equipamentos para a realização de trabalhos, pelos seus ensinamentos sobre farmacologia médica e sobre a vida;

ao **Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães**, pelas conversas e ensinamentos sobre farmacologia bem como sobre a vida e cultura; à **Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado**, pela gentileza de permitir a minha presença constante em seu laboratório para momentos “coffee” com meus amigos que lá trabalham.

À minha colega e amiga **Ana Tereza Gomes Guerrero** que além de ter contribuído com os experimentos com camundongos no modelo de artrite, foi também a responsável por conseguir os antagonistas seletivos do receptor para C5a, sem isso, este trabalho não teria sido realizado, obrigada!

Aos técnicos **Ieda Regina dos Santos Schivo** e **Sérgio Roberto Rosa** que além de me ensinarem as técnicas empregada neste e noutros trabalhos, também foram imprescindíveis os seus auxílios técnicos durante todo o desenvolvimento da tese. Agradeço também pelo imenso carinho e amizade que tiveram por mim desde o dia que cheguei no laboratório e sempre se dispuseram a me ajudar em tudo, inclusive na mudança de casa... Meu carinho por vocês também são os mesmos, muito obrigada!!!

À técnica **Giuliana Bertozi Francisco**, pelo auxílio técnico nos experimentos de dosagem de citocinas e pelo seu carinho e amizade.

Ao **Prof. Dr. Stephen M. Taylor** e ao **Dr. Trent M. Woodruff** que forneceram os antagonistas de C5a.

À **Ana Kátia dos Santos**, **Diva Amábile Montanha de Souza** e **Fabíola Leslie Antunes Cardoso Mestriner**, pelo auxílio técnico e pelo carinho que sempre tiveram por mim, às risadas estrondosas da Diva que é minha companheira sonora nos corredores da farmacologia...

À **Eleni Luiza Tamburu Gomes**, pelo auxílio técnico e pela disposição em propor padronização de uma técnica de corte histológico.

Às bioteristas **Maria Inês Castrechini Nemoto** e **Eliana Beatriz Castrechini de Barros**, pelos cuidados com os nossos animais de experimentação.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia: **Sônia Maria Stefanelli de Andrade**, **Fátima Helena Ferreira Petean** e **José Waldik Ramon** pelo carinho e amizade que sempre me deram e pela excelente competência em resolver todos os nossos problemas, dificuldades e dúvidas de burocracia, muito obrigada!!!

À **Valéria Cristina Squissato**, à **Vanessa Rinhel Del Bem Mariotto** e ao **Acácio Antunes Cardoso**, pelo apoio, disposição e eficiência em resolver as inúmeras questões de secretariado e burocráticas desde quando comecei a vir para Ribeirão Preto (a curso, em 2001) e pela amizade de vocês!

Ao **Waldiceu Aparecido Verri Júnior**, pelo ensinamento da técnica de imunização bem como pelas inúmeras discussões e soluções para este trabalho, além das diversas versões de correção do artigo publicado, pela amizade e às divertidas conversas no laboratório que tornavam o clima sempre agradável.

Ao **Thiago Mattar Cunha**, pelas discussões e soluções deste trabalho, assim como as inúmeras correções e organização deste trabalho para a publicação.

Aos meus amados **PAIS, “Roberto & Karina” – 丁国庆，许凤娣** –, que mesmo não concordando com a minha opção de continuar os estudos após a graduação esperando que iniciasse logo a carreira de odontóloga ou mesmo de empresária, sempre me ajudaram no que podiam e no que eu precisava, pois sei que no fundo, sempre sentiram um imenso orgulho por ter uma filha mestre e agora, doutora de título e não apenas de profissão, obrigada!!! **谢谢爹爹，妈咪。我爱您们！**  
(Trad.: Obrigada Papai e Mommy. Eu amo vocês!)

Às minhas queridas e amadas amigas irmãs de coração **Samira Furlan Miguel e Cristiane Machado** que mesmo distantes, nunca deixaram de participar da minha vida e estarem presentes nem que sejam através de um e-mail, MSN ou por telefone, amo vocês!!!

Aos meus queridos amigos da USP que fizeram parte da minha vida “uspiana” e que irão eternamente permanecer dentro do meu coração, alguns que já foram embora, outros que voltaram e alguns que ainda irão permanecer... **Mani Indiana Funez (Manizinha)**, minha outra irmã de coração que adquiri), **Luiz Borges Bispo da Silva, Christiane Becari, Laura Letícia de Souza, Joice Maria Cunha, Michel Antunes de Carvalho, Sabrina Nagasaki, Quintino Moura Dias Júnior, Alline Cristina de Campos, Renato Leonardo de Freitas, Daniela Sachs, Vivian Fontaniva de Lima, Jader Mileto, Cristiane Flora Villarreal, Fabrício Rios Santos, João Walter de Souza da Silveira, Denis de Melo Soares.**

Aos meus colegas e amigos do laboratório de dor e inflamação: **Paulo, Celina, Dionéia, Flávia, Djane, Cris Silva, Marcos, Guilherme, Samuel, Luiz Fernando, Igor, Pedro, Daniel, Andressa Domingues, Dani Secco, Andressinha, Spiller, Thiago Garlet, Renata, Fabiane, Fabrício Souto, Sandra Fukada, Zeca, Vanessa Carregaro, Silvio, Henrique, Thiago**... pelo agradável convívio nos laboratórios.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** que forneceram auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

***RESUMO***

## RESUMO

**TING, E. *O papel do complemento C5a na hipernocicepção mecânica inflamatória: o potencial do uso de antagonistas do receptor C5a para o controle da dor inflamatória.***

O fator C5a é um produto liberado na ativação do sistema complemento, exibe um amplo espectro de atividades inflamatórias, particularmente quimioatração de neutrófilos. No presente estudo, o papel do C5a na gênese da hipernocicepção inflamatória foi investigada em ratos e em camundongos utilizando o antagonista específico do receptor C5a, PMX53 (AcF-[OP (D-Cha) WR]). A hipernocicepção mecânica foi avaliada através do teste de Randall-Selitto modificado em ratos e o teste de Von Frey eletrônico modificado em camundongos. As citocinas foram medidas pelo método de ELISA e a migração de neutrófilos foi determinada indiretamente pela atividade de mieloperoxidase (MPO). O pré-tratamento local dos ratos com PMX53 (60-180 µg/pata) inibiu a hipernocicepção induzida por zimosan, carragenina, lipopolissacarídeo (LPS) e antígeno (OVA). Estes efeitos estão associados ao bloqueio do receptor C5a. O PMX53 foi capaz também de inibir a hipernocicepção induzida pelo soro ativado por zimosan (ZAS) e o próprio C5a, mas não quando os mediadores hipernociceptivos eram prostaglandina E<sub>2</sub> e dopamina que exercem ações diretas sobre o receptor da membrana na fibra aferente primária (nociceptor). Paralelamente aos mecanismos hipernociceptivos envolvendo C5a, PMX53 não alterou a liberação de citocinas induzida por estímulos inflamatórios. No entanto, PMX53 inibiu a hipernocicepção induzida por citocinas. O PMX53 também inibiu o recrutamento de neutrófilos induzido por zimosan, mas não por carragenina ou LPS, indicando uma participação de neutrófilos no efeito hipernociceptivo induzido por C5a. Além disso, a hipernocicepção induzida por C5a foi diminuída em ratos com depleção de neutrófilos. Em camundongos, o PMX53 foi capaz de reduzir a hipernocicepção articular induzida por zimosan ou TNF- $\alpha$ . Estes resultados sugerem que C5a é um importante mediador hipernociceptivo inflamatório que participa de um mecanismo independente da liberação de citocinas hipernociceptivas, porém dependentes da presença de neutrófilos. Com isso, a inibição de C5a parece ter um potencial para constituir uma nova terapia para o controle da dor inflamatória.

**Palavras-Chaves:** dor inflamatória; hipernocicepção; C5a; sistema complemento; neutrófilos; citocinas.



***ABSTRACT***

**ABSTRACT**

**TING, E. *Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain.***

C5a, a complement activation product, exhibits a broad spectrum of inflammatory activities particularly neutrophil chemoattraction. Herein, the role of C5a in the genesis of inflammatory hypernociception was investigated in rats and mice using the specific C5a receptor antagonist, PMX53 (AcF-[OP(D-Cha)WR]). Mechanical hypernociception was evaluated with a modification of the Randall-Selitto test in rats and electronic pressure meter paw test in mice. Cytokines were measured by ELISA and neutrophil migration was determined by myeloperoxidase activity. The local pretreatment of the rats with PMX53 (60-180 µg/paw) inhibited zymosan-, carrageenan-, lipopolysaccharide (LPS)- and antigen (OVA)-induced hypernociception. These effects were associated with C5a receptor blockade since PMX53 also inhibited the hypernociception induced by zymosan-activated serum (ZAS) and C5a but not by the direct-acting hypernociceptive mediators, prostaglandin E2 and dopamine. Underlying the C5a hypernociceptive mechanisms, PMX53 did not alter the cytokine release induced by inflammatory stimuli. However, PMX53 inhibited cytokine-induced hypernociception. PMX53 also inhibited the recruitment of neutrophils induced by zymosan but not by carrageenan or LPS, indicating an involvement of neutrophils in the hypernociceptive effect of C5a. Furthermore, the C5a-induced hypernociception was reduced in neutrophil-depleted rats. Extending these findings in rats, blocking C5a receptors also reduced zymosan-induced joint hypernociception in mice. These results suggest that C5a is an important inflammatory hypernociceptive mediator, acting by a mechanism independent of hypernociceptive cytokine release, but dependent on the presence of neutrophils. Therefore, we suggest that inhibiting the action of C5a, has therapeutic potential in the control of inflammatory pain.

**Key words:** inflammatory pain; hypernociception; C5a; complement system; neutrophils; cytokines.

## *SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Dor .....	16
1.2 Dor Inflamatória .....	19
1.3 Migração Leucocitária .....	22
1.4 A Hipernocicepção e Migração Leucocitária .....	24
1.5 O Fator C5a do Complemento .....	25
1.6 O C5a na Dor Inflamatória .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 Animais Experimentais .....	30
3.2 Avaliação Hipernociceptiva .....	30
3.2.1 Teste da pressão constante na pata de rato .....	30
3.2.2 Teste da pressão crescente na pata de camundongo: avaliação da flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal .....	32
3.3 Procedimento para Imunização Ativa em Ratos .....	35
3.4 Preparo do Soro Ativado por Zimosan .....	35
3.5 Recrutamento de Neutrófilos .....	35
3.6 Determinação de Níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	36
3.7 Protocolos Experimentais .....	37
3.7.1 Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica, migração de neutrófilos e liberação de citocinas induzidas por zimosan, LPS, carragenina ou OVA .....	37
3.7.2 Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica e migração de neutrófilos induzido por C5a ou Soro Ativado por Zimosan (ZAS) .....	38
3.7.3 Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por BK, TNF- $\alpha$ , CINC-1, IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub> e dopamina em ratos .....	39
3.7.4 Efeito do sulfato de vimblastina na hipernocicepção mecânica e na migração de neutrófilos induzida por zimosan, C5a ou carragenina .....	39
3.8 Drogas .....	40
3.9 Análise Estatística .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 Participação do fator C5a na hipernocicepção mecânica inflamatória .....	42
4.2 O C5a não interfere na liberação da cascata de citocinas hipernociceptivas .....	51
4.3 O C5a participa da hipernocicepção mecânica induzida por citocinas .....	53
4.4 A participação de neutrófilos na hipernocicepção inflamatória induzida por C5a .....	55
4.5 A participação do C5a na gênese da hipernocicepção mecânica articular induzida por zimosan ou TNF- $\alpha$ em camundongo .....	59
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>
<b>ARTIGO PUBLICADO</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXO: Carta de Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	<b>91</b>

## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1994) define dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou ainda, descritas em termos que sugerem tal dano”. Sendo assim, a dor é uma experiência complexa e subjetiva, formada por um componente sensório-discriminativo, que permite identificar o estímulo como doloroso e localizar a origem da lesão, e um componente emocional-motivacional, que envolve a aprendizagem, a memória e as reações à dor. Devido a essa complexidade, existem diversos termos que foram criados para descrevê-la. Na sua maioria, tais termos estão relacionados aos fenômenos que acompanham o processo fisiopatológico da dor no homem e que nos dias atuais ainda são utilizados para descrever fenômenos semelhantes em animais experimentais. Na revisão e discussões durante esses últimos anos em nosso laboratório e também propostos inúmeras vezes por prof. Dr. Sérgio H. Ferreira em reuniões anuais da IASP, os termos como dor, dor inflamatória, hiperalgesia e analgesia passam a serem descritos cada vez mais comumente no meio científico como nocicepção, nocicepção inflamatória, hipernocicepção e antinocicepção, respectivamente.

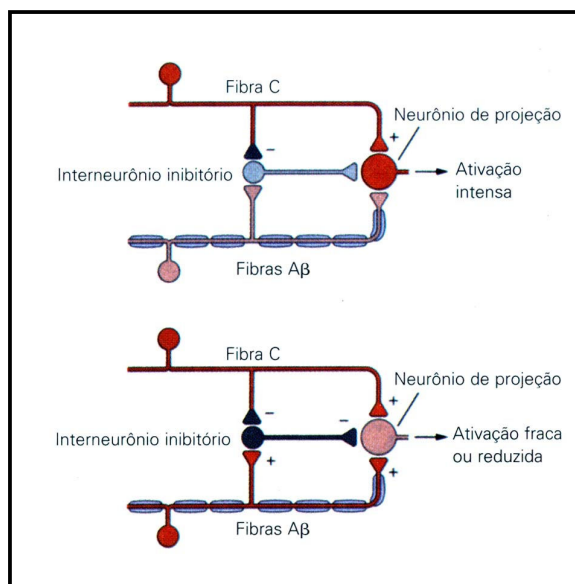
A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”) é a detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. O estímulo nocivo ou nociceptivo, seja ele físico (mecânico ou térmico) ou químico (substâncias químicas e/ou mediadores químicos) é detectado por nociceptores que são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas de fibras aferentes primárias. Estas fibras estão amplamente distribuídas na pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras. As fibras que inervam a cabeça e pescoço compõem os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares em núcleos presentes no tronco cerebral, enquanto que os corpos celulares das fibras que inervam tronco e membros estão localizados nos gânglios da raiz dorsal dos nervos espinais (BESSON; CHAOUCH, 1987; JULIUS; BASBAUM, 2001; PRADO, 1999).

Duas classes principais de fibras aferentes primárias nociceptivas foram classificadas de acordo com seus critérios anatômicos: fibras de pequeno e médio diâmetro. As fibras de médio calibre são finas e mielinizadas, conhecidas por fibras A delta ( $A\delta$ ), e apresentam uma velocidade de condução entre 12-30 m/s (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999). Estas correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de duração rápida, aguda e lancinante sentida logo após a estimulação nociva. As fibras de pequeno calibre são as fibras do tipo C, elas não possuem mielina e, portanto apresentam velocidade de condução menor, entre 0,5-2 m/s, sendo responsáveis pela dor de duração longa e difusa (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999) e correspondem a 80% das fibras condutoras da informação nociceptiva. Estas fibras também são chamadas de polimodais, pois respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos, enquanto que as fibras  $A\delta$  respondem apenas a estímulos nocivos térmicos e mecânicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Existe ainda uma terceira classe de fibras aferentes primárias, as fibras A beta ( $A\beta$ ), que são fibras de largo diâmetro, mielinizadas, com rápida velocidade de condução (30-100 m/s) e normalmente respondem a estímulos táteis, mas que estão envolvidas no processo de modulação do estímulo doloroso (DUBNER; BENNETT, 1983) conforme a teoria da comporta proposta por Melzak e Wall (1965) (Figura 1). Porém, em situações patológicas, estas fibras podem passar a responder como nociceptores e então, os estímulos táteis inócuos passam a ser interpretados como nocivos dando origem ao fenômeno de alodinia (KANDEL; SCHWART; JESSEL, 2003).

Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas fazem sinapses diretamente com os neurônios secundários em núcleos no tronco cerebral. Já os localizados nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central através dos nervos espinais, que inervam a coluna dorsal da medula espinal, no qual fazem sinapses com neurônios secundários. As sinapses medulares ocorrem na substância cinzenta da medula espinal, esta, por sua vez, foi dividida em dez lâminas por Rexed (1954) com base na citoarquitetura, sendo a lâmina I, a mais

superficial. A maioria dos nociceptores termina nas lâminas superficiais, as fibras A $\delta$  fazem sinapse com neurônios secundários das lâminas I, II e V e as fibras C com neurônios da lâmina II (BESSON; CHAOUCH, 1987; PRADO, 1999; RIEDEL; NEECK, 2001). A lâmina II, também conhecida por substância gelatinosa, possui interneurônios inibitórios que se projetam para outras regiões do corno dorsal, como para as lâminas I e V, constituindo uma área importante para a regulação da transmissão nociceptiva ao nível da primeira sinapse. Os neurônios secundários presentes na lâmina I possuem alto limiar de excitabilidade e, assim como os nociceptores, respondem a estímulos intensos, sendo, portanto denominados nociceptivos específicos. Os neurônios secundários que fazem sinapse na lâmina V respondem a estímulos de intensidade variada e são designados neurônios de ampla faixa dinâmica. A magnitude das respostas dos neurônios no corno dorsal da medula espinal não ocorre simplesmente em função da natureza da informação nociceptiva aferente, ela é resultado de uma série de sistemas neuronais distintos que funcionam modulando os eventos que acontecem durante o processamento da informação nociceptiva.



**Figura 1 – Modulação localizada da dor de acordo com a teoria da comporta (MELZAK; WALL, 1965). Reproduzida de KANDEL em “Princípios da Neurociência” – 4ª Ed., 2003.**



A comunicação do neurônio primário com o secundário depende da liberação de neurotransmissores como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MORTON; HAUTCHINSON, 1989), somatostatina, peptídeo vasoativo intestinal (KUO; KAWATANI; DE GROAT, 1985), dentre outros. Os neurotransmissores mais estudados e provavelmente os mais envolvidos na transmissão nociceptiva são a substância P (GARRY; HARGREAVES, 1992) e o glutamato (ZHANG; BENVENISTE; PIANTADOSI, 1993). Os axônios dos neurônios secundários que partem da medula ascendem para áreas supraespinais formando os tratos nervosos específicos: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinocervicotalâmico, espinoparabraquial, espinoparabraquio (trigêmio) hipotalâmico e a via pós-sináptica da coluna dorsal. Estes tratos dirigem-se para o tálamo ou convergem no tálamo após contraírem sinapse em estações intermediárias. Já no tálamo, os neurônios de terceira ordem conduzem a informação nociceptiva para áreas sensitivas do córtex cerebral. Nestas estruturas, vários aspectos das sensações, dentre elas, a dor, são processados: qualidade, intensidade, localização, duração e o seu aspecto emocional ou afetivo (BESSON; CHAOUCH, 1987; MILLAN, 1999; PRADO, 1999).

## **1.2 Dor Inflamatória**

Um denominador comum a todos os tipos de dor inflamatória é a sensibilização de nociceptores. Este fenômeno é resultado da liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes e migratórios no local da lesão tecidual. Enquanto alguns outros mediadores atuam sensibilizando os nociceptores, ou seja, diminuindo o limiar de ativação, como fazem as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), as aminas simpatomiméticas e os leucotrienos, outros ativam diretamente os nociceptores, como a histamina, serotonina, bradicinina, ATP causando imediata manifestação da dor (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003). Durante a liberação de mediadores químicos de várias origens celulares decorrentes da lesão tecidual local, pode ocorrer a sensibilização e/ou ativação direta dos nociceptores (FLÓREZ, 1993). Do ponto de vista eletrofisiológico, a sensibilização dos nociceptores é

caracterizada pela redução do limiar necessário para ativá-los, pelo aumento da atividade espontânea do neurônio e pelo aumento da frequência de disparos em resposta a estímulos supralimiais (RIEDEL; NEECK, 2001). Atualmente já está bem aceito que a sensibilização de neurônios nociceptivos primários é o denominador comum da dor inflamatória e que leva a estágios conhecidos como hiperalgesia/alodinia em humanos ou hipernocicepção em modelos animais (CUNHA *et al.*, 2007).

Em modelos experimentais, este fenômeno tem sido atribuído à ação direta de mediadores inflamatórios hipernociceptivos (prostaglandinas e aminas simpatomiméticas) sobre seus receptores presentes na membrana do nociceptor, no qual, em última instância, induz a diminuição do limiar do nociceptor, aumentando a excitabilidade da membrana neuronal (COUTAUX *et al.*, 2005; FERREIRA; LORENZETTI; CORREA, 1978; KHASAR; McCARTER; LEVINE, 1999). Estas evidências também já foram demonstradas tanto em experimentos comportamentais em humanos (FERREIRA, 1983), bem como através de eletrofisiologia em animais (HANDWERKER, 1976; CHAHL; IGGO, 1977; PERL, 1976).

Em vista do que foi descrito anteriormente, a hipernocicepção pode ser descrita como resultado da sensibilização dos neurônios sensitivos primários associados a nociceptores polimodais de alto limiar ou a nociceptores silenciosos. Esta classe de nociceptores está presente no tecido articular e em alguns outros tecidos como no tecido visceral, apresenta limiar de ativação muito elevado e, portanto, não são ativados por estímulos nocivos agudos (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988). Entretanto, a sensibilização destes nociceptores ocorre durante o processo inflamatório, como consequência da liberação de substâncias algésicas, tais como prostaglandinas e bradicininas. O aumento do influxo sensorial resultante da sensibilização periférica dos nociceptores conduz à subsequente sensibilização do componente central, sendo este, o responsável por modificações na percepção da dor (HANESCH; HEPPELMANN; SCHMIDT, 1992; SCHAIBLE; EBERSBERGER; BANCHET, 2002).

Hingtgen, Waite e Vasko (1995) demonstraram que a PGE<sub>2</sub>, dopamina ou carbaprostaciclina (análogo estável da prostaciclina), ao se ligar a seus receptores específicos, induz em aumento da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>), causando a

sensibilização dos nociceptores. Corroborando estes dados, Ferreira e Nakamura (1979) utilizando o teste de pressão constante na pata de ratos (Randall-Selitto modificado), observaram a manifestação de hipernocicepção mecânica após administrarem intraplantarmente dibutilil-AMPc (análogo de AMPc), de A23187 (ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ), os quais levam ao aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes resultados alinham-se com a observação de que receptores adrenérgicos e prostanóides estão acoplados à enzima adenilil ciclase, responsável pela síntese de AMPc (HINGTGEN; WAITE; VASKO, 1995; NAMBAL *et al.*, 1994; SMITH; BRETT; CHURCH, 1998).

Em vista desses resultados, o aumento de AMPc foi relacionado com a hipernocicepção inflamatória periférica (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990). Em contribuição a esses dados, Cunha, Teixeira e Ferreira (1999), utilizando o teste da pressão crescente na pata de ratos, observaram que níveis elevados de AMPc estão relacionados à hipernocicepção. Por outro lado, altos níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) demonstraram atividade antinociceptiva. Portanto, na hipernocicepção mecânica parece haver um balanço entre os níveis de AMPc e GMPc, sendo que altos níveis de AMPc provocam hipernocicepção, enquanto que altos níveis de GMPc induzem a antinocicepção.

De todos os mediadores liberados durante o processo inflamatório responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, provavelmente os que tenham sido mais intensamente estudados na hipernocicepção inflamatória são as prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ), a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) e as aminas simpatomiméticas (FERREIRA; LORENZETTI; CORREA, 1978; LEVINE *et al.*, 1986; NAKAMURA; FERREIRA, 1987).

As prostaglandinas são metabólitos resultantes da ação da enzima cicloxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico, o qual é produto da biotransformação dos fosfolípidos da membrana celular. Existem duas principais isoformas da enzima COX, sendo a COX-1 e a sua variante (COX-3) consideradas constitutivas, e a COX-2, a qual é induzida em tecidos periféricos por citocinas, fatores de crescimento ou por outros mediadores inflamatórios. No entanto, existem demonstrações de que em

alguns tecidos como o rim, o cérebro, os ovários e o útero, a COX-2 parece ser constitutiva (DINCHUK *et al.*, 1995; MORHAM *et al.*, 1995).

Apesar das prostaglandinas e das aminas simpatomiméticas serem os mediadores finais da hipernocicepção inflamatória periférica, a liberação destes mediadores normalmente é precedida pela liberação de outros mediadores, como por exemplo, as citocinas. A lesão tecidual induz uma resposta de alarme precoce no qual os macrófagos desempenham um papel importante, sinalizando a presença de estímulos deletérios para o organismo, provavelmente através da liberação de citocinas. Sendo assim, as citocinas parecem estar ligadas entre injúria celular ou o reconhecimento de antígenos e na liberação de mediadores responsáveis pelo desenvolvimento de sinais e sintomas locais e/ou sistêmicos da inflamação (POOLE; CUNHA; FERREIRA, 1999). Estudos recentes em nosso laboratório conseguiram estabelecer os passos dessa cascata de citocinas (CUNHA *et al.*, 2005; VERRI JR *et al.*, 2006). Quando se induz um estímulo inflamatório, desencadeia a liberação do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e, por sua vez, estimula a liberação de duas vias hipernociceptivas: a via que induz a liberação de interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), que tem como mediador final os prostanóides; e a via das quimiocinas CXC ou citocina químio-atraente de neutrófilo do tipo 1 (CXCL8/IL-8 em humanos, ou CINC-1 em ratos), que tem como mediador final aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 1991, 1992; FERREIRA *et al.*, 1988; LORENZETTI *et al.*, 2002). Esse conjunto de eventos é crucial à geração da hipernocicepção inflamatória. Entretanto, é importante lembrar que existem outros mediadores inflamatórios e células que também participam do processo inflamatório, como o fator de crescimento neural (WOOLF *et al.*, 1994), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (GUERRERO *et al.*, 2008) e neutrófilos, que são recrutados por via do fator C5a do complemento (LEVINE *et al.*, 1985), entre muitos outros.

### 1.3 Migração Leucocitária

A migração leucocitária para o local da lesão tecidual é uma das etapas principais da defesa do organismo frente a um agente agressor. Durante o estágio inicial, na maioria dos processos inflamatórios,

o glóbulo branco que se apresenta de forma predominante é o neutrófilo, estando presentes no local, principalmente, entre doze e vinte e quatro horas. Após esse período, o neutrófilo inicia o seu processo de morte programada (apoptose), sendo posteriormente fagocitado por macrófagos. Outras células como eosinófilos, macrófagos e linfócitos começam a surgir no local após a décima hora e permanecem por aproximadamente uma semana no local ou até quando o agente agressor for removido, caso contrário, ocorre a cronificação do processo inflamatório (GALLIN; SNYDERMAN, 1999; INSEL, 1996).

O processo de migração começa pelo rolamento, seguido de adesão firme do leucócito ao endotélio vascular e por fim, a transmigração. O aumento da aderência entre os leucócitos e o endotélio vascular é mediado pela expressão de um conjunto de proteínas de membrana conhecidas por moléculas de adesão. Dentre essas moléculas, destacam-se as selectinas (L-, E-, P-selectina) e seus respectivos ligantes (carboidratos). As  $\beta$ 2-integrinas se ligam às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como o VCAM-1, PECAM-1 e ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, mediando a adesão firme e a transmigração dos neutrófilos (ZIMMERMAN; PRESCOTT; McINTYRE, 1992).

Já aderidos ao endotélio, os neutrófilos atravessam a barreira endotelial por aberturas entre as células endoteliais ou através destas (diapedese e migração transendotelial, respectivamente) e então, dirigem-se ao foco da lesão. A liberação de mediadores quimiotáticos como a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, fator de agregação plaquetária, histamina, C5a e quimiocinas no sítio inflamatório forma um gradiente de concentração dessas substâncias que é fundamental para o correto direcionamento dos leucócitos para o foco inflamatório (HARKNESS, 1981).

Além de realizarem fagocitose, os neutrófilos também são células secretoras e ao interagirem com uma grande variedade de estímulos (mediadores liberados por células residentes, componentes do antígeno ou próprio antígeno) no foco inflamatório, culminando à liberação de substâncias microbidas e mediadores pró-inflamatórios. Em pouco tempo, após a interação de um neutrófilo com os estímulos, ocorre a liberação de espécies reativas do oxigênio e produtos lipídicos. Em seguida, acontece a liberação de enzimas pré-formadas e proteínas que estavam armazenadas dentro de vesículas.

Finalmente, a ativação da transcrição de genes resulta (em algumas horas) na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (BERTON, 1999).

#### 1.4 A Hipernocicepção e Migração Leucocitária

Uma boa parte da literatura tem relatado os efeitos hipernociceptivos de mediadores como a bradicinina (BK), o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e CINC-1 separadamente de seus efeitos quimiotáticos. Entretanto, a hipernocicepção induzida por alguns mediadores nociceptivos como o LTB<sub>4</sub>, o fator de crescimento neural (NGF) ou C5a, por exemplo, pode ser abolida com a depleção de neutrófilos (BENNETT *et al.*, 1998; BISGAARD; KRISTENSEN, 1985; LEVINE *et al.*, 1984, 1985), o que está em concordância com a hipótese da relação entre migração leucocitária e hipernocicepção.

Ferreira *et al.* (1993) e Ferreira, Lorenzetti e Pool (1993) demonstraram que o primeiro mediador nociceptivo a ser liberado em resposta a estímulos como LPS ou carragenina em modelos animais experimentais é a BK, que separadamente foi relacionada à migração leucocitária pela ativação de seus receptores B<sub>2</sub> em modelo de pleurite (SALEH; CALIXT; MEDEIROS, 1997) e peritonite (SANTOS; CALIXTO; SOUZA, 2003). Na seqüência da cascata apresentada anteriormente, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  aumentam a permeabilidade do endotélio vascular e a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina e ICAM-1, favorecendo os processos de adesão e migração celular. Os eicosanóides também são capazes de aumentar a expressão das moléculas de adesão (WONG; PRAMEYA; DOROVINI-ZIS, 1999). Continuando na cascata, a IL-8/CINC-1 que é liberada pela indução de TNF- $\alpha$ , tem a atividade quimiotática ainda mais reconhecida que de outras citocinas como a de IL-1 $\beta$ , agindo tanto em neutrófilos como em linfócitos (BODDEKE, 2001). A partir destas evidências, os mediadores que induzem a hipernocicepção ou por via prostanóide (BK  $\rightarrow$  TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  IL-1 $\beta$   $\rightarrow$  PGE<sub>2</sub>), ou via amina simpatomimética (BK  $\rightarrow$  TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  IL-8/CINC-1  $\rightarrow$  amina simpatomimética) teve a sua atividade quimiotática demonstrada.

## 1.5 O Fator C5a do Complemento

Durante estas últimas décadas, tem chamado atenção o papel do sistema complemento na gênese do processo inflamatório bem como de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide (SARMA; HUBER-LANG; WARD, 2006; VAKEVA *et al.*, 1998; WOODRUFF *et al.*, 2002). Um dos maiores componentes efetores do sistema complemento é o fator C5a.

O fator C5a do complemento é um produto/fragmento livre da proteólise de C5 que inicia a etapa tardia da ativação do complemento. Tanto o C5a como C3a e C4a, também chamadas de anafilatoxinas, estão relacionados ao processo de inflamação aguda através da sua ação sobre mastócitos, desgranulando-os promovendo, desta forma, a liberação de histamina, serotonina e outros mediadores. Entretanto, o C5a é o mediador mais potente desses três, sendo 20 vezes mais potente que o C3a e 2500 vezes mais que o C4a (ABBAS; LICHTMAN, 2004). Além de atuar sobre mastócitos, o C5a age também sobre os neutrófilos estimulando a sua motilidade e a adesão firme nas células endoteliais, aumenta também a sua capacidade de fagocitose e liberação de grânulos enzimáticos (HETLAND; PFEIFER; HUGLI, 1998). Quando em altas doses, o C5a é capaz ainda de aumentar no neutrófilo a sua atividade respiratória e a produção de intermediários reativos do oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil (HO), que têm atividade bactericida. A combinação das ações de C5a no mastócito, no neutrófilo e nas células endoteliais contribui para o estabelecimento do processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2004).

Já os efeitos pró-inflamatórios dessas anafilatoxinas são mediados através de ligações a receptores específicos em vários tipos celulares. O receptor para C5a é o mais bem caracterizado, é membro da família de receptores transmembrânicos com 7  $\alpha$ -hélices e usa proteínas triméricas (proteína G) de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP) para ativar a sua via de sinalização. Esse receptor está expresso em vários tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, células musculares lisas, astrócitos e basófilos (ABBAS; LICHTMAN, 2004; CHENOWETH; HUGLI, 1978; GERARD *et al.*, 1989; WERFEL *et al.*, 1992). Dessa forma, é

compreensível que o C5a apresente ampla atuação nos diversos tipos de processos inflamatórios e locais distintos do organismo.

### 1.6 O C5a na Dor Inflamatória

Foi demonstrado que o sistema complemento está envolvido na sepse, no choque, em lesão sem corte, lesão cirúrgica, queimaduras, isquemias e artrites, dos quais participa por iniciar a ativação nociceptiva inflamatória em vários estágios (agudo, subagudo e até mesmo crônico). A inibição da cascata de complemento no processo inflamatório acarreta uma redução da liberação de vários mediadores inflamatórios que sustentam a nocicepção, como íons hidrogênio, aminas biogênicas, eicosanóides e neuropeptídeos, entre outras moléculas (MASTELOS; GERMENIS; LAMBRIS, 2005). Além disso, sabe-se também que C5a aumenta respostas inflamatórias por ativar a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, aminas bioativas, ânion superóxido e enzimas intracelulares (EMBER; JAGELS; HUGLI, 1999; GERARD, C.; GERARD, N.P., 1994).

Entretanto, o papel de C5a na dor inflamatória ainda não está bem compreendido. Em estudo anterior, Levine *et al.* (1985) demonstrou que a injeção intraplantar (intradérmica) de C5a foi capaz de produzir uma hipernocicepção mecânica que era dependente da presença de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). A relação da migração de neutrófilos e a hipernocicepção inflamatória tem sido demonstrado em outros estudos (DE ABREU CASTRO; FERREIRA, 1979; LAVICH *et al.*, 2006). Twining *et al.* (2005) também mostraram evidências da participação do sistema complemento na medula espinal induzindo hipernocicepção mecânica em três diferentes modelos de neuropatia (ligadura do nervo ciático, infecção viral do nervo ciático e aplicação do zimosan no ramo do nervo ciático). Clark *et al.* (2006) também sugeriram a participação do C5a na hipernocicepção inflamatória utilizando-se o modelo de lesão incisional na pata de camundongos e ainda procuraram relacionar com a presença de diversas citocinas pró-inflamatórias. Contudo, não se sabe exatamente ainda quais são os mecanismos ou a co-relação, se existe, entre esses mecanismos na hipernocicepção.



## ***2. OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- I – Estudar o papel do C5a na gênese da resposta hipernociceptiva inflamatória periférica.
- II – Usando uma nova ferramenta, o antagonista específico do receptor para o C5a – PMX53 –, avaliar o papel do C5a endógeno liberado na resposta inflamatória imune inata e adaptativa e o seu possível mecanismo na resposta hipernociceptiva mecânica.
- III – Avaliar a participação do C5a na migração celular de neutrófilos induzida pela resposta inflamatória periférica, assim como a relação da presença de neutrófilos induzida direta ou indiretamente por C5a com a hipernocicepção mecânica.
- IV – Avaliar a possível participação do C5a na liberação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na resposta inflamatória periférica.

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) bem como as estabelecidas pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e constaram com a prévia aprovação do mesmo (ANEXO).

#### 3.1 Animais Experimentais

Foram usados ratos Wistar machos (pesando entre 180-200 g) e camundongos isogênicos C57/BL6 (selvagens) machos (pesando entre 20-25 g) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (campus Ribeirão Preto). Antes de serem submetidos aos ensaios biológicos, os animais permaneceram cerca de 2 dias no Biotério do Departamento de Farmacologia, alojados em caixas apropriadas (5 por caixa) sob condições de temperatura (22-25 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h controlados, com acesso a água e ração *ad libitum*.

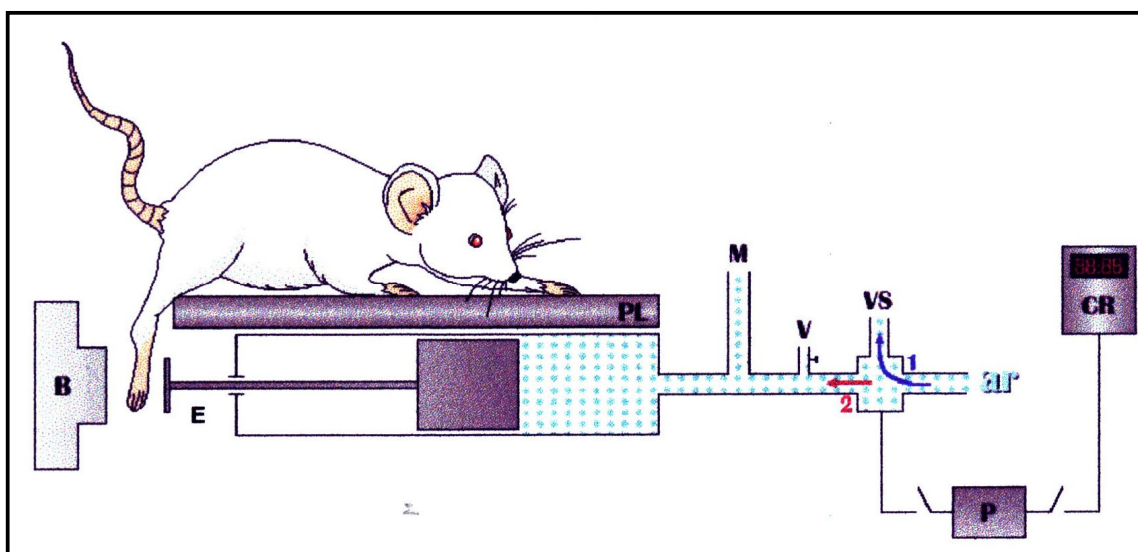
#### 3.2 Avaliação Hipernociceptiva

Os testes hipernociceptivos foram realizados no período claro entre 09:00 e 17:00 h. Para cada grupo experimental foram usados até 6 animais.

##### 3.2.1 Teste da pressão constante na pata de rato

Essa técnica foi inicialmente descrita por Randall e Selitto (1957) e posteriormente modificada por Ferreira, Lorenzetti e Correa (1978). O animal é colocado em uma plataforma e mantido em decúbito ventral pela mão do experimentador. Qualquer uma das patas traseiras pode ser submetida a uma pressão constante de 20 mmHg aplicada por um pistão com uma área de 15 mm<sup>2</sup>. A pressão é interrompida quando o animal exhibe a reação típica interpretada como nociceptiva, caracterizada por redução dos movimentos de fuga, seguida de alterações na frequência respiratória, fasciculações no

dorso e retração da cabeça e das patas dianteiras (Figura 2). As drogas foram administradas por injeção intraplantar (i.pl.) usando uma microsseringa de Hamilton de 100  $\mu$ L. A agulha foi introduzida subcutaneamente próximo ao terceiro dígito, com a ponta da agulha alcançando a metade da planta da pata traseira. A reação basal à estimulação mecânica foi medida antes da primeira injeção intraplantar, utilizando-o como valor medido a zero hora (controle da reação). Assim, a intensidade da hipernociceção mecânica foi quantificada como redução do tempo da reação, calculado pela subtração dos valores subseqüentes medidos após a injeção do estímulo com a primeira medida (zero hora) (FERREIRA; LORENZETTI; CORREA, 1978).



**Figura 2 – Diagrama do aparelho usado para avaliação da hipernociceção em ratos.** O animal é colocado sobre a plataforma (PL) e a sua pata é posicionada entre a plataforma e a barra (B). O ar é pressionado constantemente dentro do sistema, mas a válvula solenóide (VS) normalmente dirige-o na direção 1. Quando o pedal (P) é ativado, ocorre simultaneamente o disparo do cronômetro (Cr) e o fechamento da válvula solenóide que faz com que o fluxo de ar seja dirigido para dentro da seringa de teflon (direção 2). A pressão no sistema pode ser monitorada por meio do manômetro (M) e permanece no valor desejado pelo experimentador através da válvula de escape (V).

### 3.2.2 Teste da pressão crescente na pata de camundongo: avaliação da flexão dorsal da articulação tibio-tarsal

Para a avaliação da hipernocicepção mecânica articular foi utilizada a modificação do método mecânico eletrônico de quantificação da intensidade da nocicepção inflamatória em camundongos (GUERRERO *et al.*, 2006).

O método de von Frey (VON FREY, 1896) é comumente utilizado para avaliar o comportamento nociceptivo. Esse foi modificado para um método eletrônico usado primeiramente em humanos (JENSEN *et al.*, 1986) e posteriormente em ratos (MÖLLER; JOHANSSON; BERGE, 1998) e em camundongos (CUNHA *et al.*, 2004), utilizando-se um estesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, *Life Science Instruments*, Califórnia, EUA). Este aparelho consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força, que expressa os valores em gramas e com precisão do aparelho de até 0,1 g. O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até atingir uma força de 80 g. O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno de área 4,15 mm<sup>2</sup> (Figura 3). Os animais foram colocados em caixas acrílicas (12 x 10 x 17 cm - largura x profundidade x altura) durante 15-30 min para adaptação (Figura 4). O assoalho da caixa é feito de uma tela reticulada de arame não maleável. A avaliação da hipernocicepção mecânica articular consiste na aplicação, por entre os retículos, de uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo (Figura 5), até que o animal flexione a região tibio-tarsal, produzindo uma resposta de retirada da pata, cada teste foi avaliado 3 vezes sucessivamente (sendo a variação permitida entre uma medida e outra de menos de 1 g). A intensidade de hipernocicepção mecânica articular é quantificada através de valores absolutos de limiar mecânico (em gramas). A medida basal não é considerada porque ocorre um deslocamento do membro posterior do animal, em função da amplitude da área da ponteira, por isso foi adotado um valor de corte (*cut off*), de 15 g (GUERRERO *et al.*, 2006). A administração de drogas na articulação tibio-tarsal foi realizada

sob anestesia dos animais, durante o qual o tratamento foi injetado dentro da articulação num volume de 5  $\mu$ L, com auxílio de uma microsseringa conectada a agulha hipodérmica 29 G (Figura 6).



**Figura 3 – Foto da ponteira utilizada no modelo de nociceção articular.\*** A foto apresenta a ponteira (de área – 4,15 mm<sup>2</sup>) utilizada na avaliação da resposta hipernociceptiva mecânica articular.

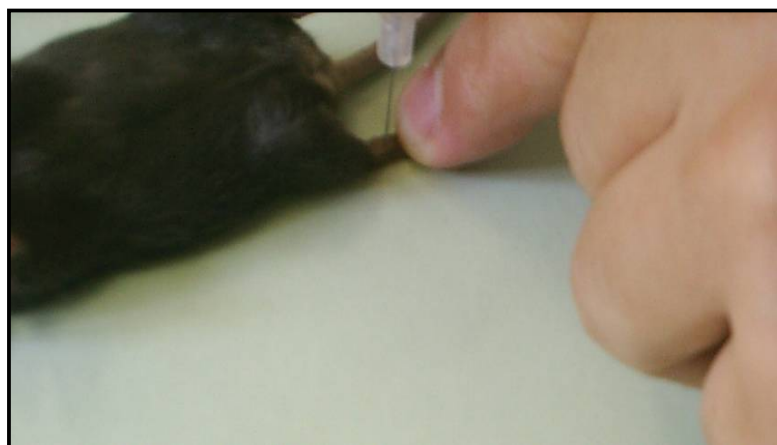


**Figura 4 – Foto do equipamento utilizado no modelo de hipernociceção mecânica articular.\*** A foto apresenta o estesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments Califórnia, EUA), as caixas de acrílico, o assoalho em tela reticulada de arame e o espelho, utilizados no modelo de hipernociceção mecânica articular.

\* Figuras cedidas gentilmente por **Ana Tereza Gomes Guerrero** (colaboradora deste trabalho) e compõem do conjunto de figuras de sua dissertação de mestrado intitulado: "Desenvolvimento de um modelo de avaliação da nociceção articular induzida por zimosan em camundongos..." (2005).



**Figura 5 – Foto no momento do teste de hipernocicepção mecânica articular.\*** A foto apresenta a ponteira em contato com a pata do animal. O experimentador aplica, por entre os retículos da tela de arame, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza flexão dorsal da articulação estimulada.



**Figura 6 – Foto da injeção intra-articular (i.a.) de zimosan.\*** A foto apresenta o procedimento para a realização da injeção i.a. de zimosan.

\* Figuras cedidas gentilmente por **Ana Tereza Gomes Guerrero** (colaboradora deste trabalho) e compõem do conjunto de figuras de sua dissertação de mestrado intitulado: "Desenvolvimento de um modelo de avaliação da nocicepção articular induzida por zimosan em camundongos..." (2005).



### 3.3 Procedimento para Imunização Ativa em Ratos

Para imunizar os animais, a ovo albumina (OVA) foi dissolvida em salina estéril, na concentração de 2 mg/mL e misturada com um volume igual de Adjuvante Completo de Freund (CFA, na concentração de 1 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* em 85% de óleo de parafina e 15% de manide mono-oleato). O CFA foi usado para aumentar a eficiência do processo de imunização (FREUND, 1956), pois ele tem o papel de prolongar o tempo de vida do antígeno injetado e também de aumentar a sua efetividade para alcançar o sistema imune. Assim, ratos pesando aproximadamente 100 g receberam 2 injeções subcutâneas em sítios distintos do dorso, sendo a dose total de 200 µg de OVA dissolvido em uma emulsão de salina estéril + CFA. Os ratos do grupo controle (sham-imunizados) receberam a injeção de emulsão sem OVA. Após 21 dias, os ratos foram, então, desafiados com a administração intraplantar de OVA (25 µg em 100 µL de salina) na pata traseira direita (CUNHA *et al.*, 2003).

### 3.4 Preparo do Soro Ativado por Zimosan

O soro ativado por zimosan (ZAS) contém o fator quimiotático C5a, que é preparado através da incubação a 37 °C do soro fresco de rato com zimosan na concentração de 10 mg/mL durante 30 min. Ao término da incubação, o zimosan é removido por centrifugação (2 vezes por 10 min a 3000 g, em temperatura ambiente), e o soro foi submetido ao banho-maria a temperatura de 56 °C por 30 min, aliquotado e mantido a -70 °C até o seu uso (TORRES; FORMAN, 1999). O soro controle foi incubado por 30 min a 37 °C sem a adição do zimosan, e os procedimentos subsequentes foram os mesmos empregados no preparo do ZAS.

### 3.5 Recrutamento de Neutrófilos

A quantificação da migração de neutrófilos no tecido subcutâneo plantar (em ratos) ou articular (em camundongos) foi realizada indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO) baseando-se na técnica descrita por Souza *et al.* (2000).

A acumulação de neutrófilos na pata de rato ou na região da articulação tíbio-tarsal de camundongo foi mensurada pela média da atividade de MPO. Após o sacrifício dos animais, tecidos subcutâneos das patas ou o complexo ósseo tíbio-tarsal foram removidos, pesados e seguiram-se os ensaios para MPO (SOUZA *et al.*, 2000). As amostras foram homogeneizadas a 5% (peso/volume) em solução tampão de EDTA/NaCl (pH = 4,7) com auxílio do Polytron® (PT 3100), seguida de centrifugação (3000 g por 15 min, a 4 °C). Na seqüência, foram re-suspendidas em tampão de brometo de hexadecil-trimetil-amônio 0,5% (pH = 5,4) e então foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram re-centrifugadas (3000 g, 15 min, a 4 °C) e 2-5 µL do sobrenadante foi usada para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi realizada com 1,6 mM de tetrametil-bezidina, 80 mM NaPO<sub>4</sub>, 0,5 mM de peróxido de hidrogênio, e a reação foi parada com 4 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados da leitura das amostras foram obtidos através da comparação com uma curva padrão, no qual se sabe o número de neutrófilos nesta curva, e portanto, os resultados das amostras foram expressos como número de neutrófilos x 10<sup>6</sup> por mg de tecido.

### 3.6 Determinação de Níveis de TNF-α e IL-1β

Para determinação das citocinas, o tecido da área plantar dos ratos tratados foi removido 3 h após tratamento e homogeneizados em 500 µL do tampão apropriado contendo inibidor de proteases (PMSF 0,1 mM), e os níveis de TNF-α e IL-1β foram determinados de acordo com a descrição de Safieh-Garabedian *et al.* (1995) pelo método de ELISA. De forma resumida, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas e incubadas com os anticorpos de carneiro anti-TNF-α de rato (2 µg/mL) ou anti-IL-1β de rato (2 µg/mL) diluídos em PBS durante 15-18 h a 4 °C. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas com PBS + 0,1% de Tween 20 e bloqueadas durante 1 h à temperatura ambiente com BSA 1%. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 12h a 4 °C com as amostras e suas respectivas curvas padrão (diluições seriadas de base 2). Posteriormente, as placas

foram lavadas novamente e incubadas com o respectivo anticorpo por 1 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de avidina-HRP (1:5000; DAKO A/S, Denmark) foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas por 30 min a temperatura ambiente, lavadas e adicionados 50 µL do substrato dicloridrato de 1,2-fenilenodiamina (ortonfenileno diamina, OPD, Sigma; 40 µg, 50 µL por poço) diluído em tampão fosfato contendo 0.4 µg/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Após 15 minutos, a reação foi interrompida através da adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M, 50 µL/poço). A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram ainda ajustados para 0,5 mL, o volume utilizado para extrair as citocinas do tecido plantar, e foram expressos como picogramas de TNF-α ou IL-1β por mililitro, baseando-se na curva padrão para cada citocina. Como grupos controles, os níveis dessas citocinas foram determinados em animais que receberam salina (100 µL, i.pl.) ou PMX53 (60 µg, 100 µL, i.pl.) 30 min antes da injeção de salina (100 µL, i.pl.)

### **3.7 Protocolos Experimentais**

#### **3.7.1 Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica, migração de neutrófilos e liberação de citocinas induzidas por zimosan, LPS, carragenina ou OVA**

Os ratos receberam injeção intraplantar (i.pl.) de salina (100 µL) ou PMX53 (60 ou 180 µg diluída em 100 µL de salina – experimentos com zimosan; ou 60 µg em 100 µL de salina – experimentos com LPS, carragenina ou OVA) 30 min antes dos estímulos zimosan (30 µg em 100 µL, i.pl.), LPS (0,5 µg em 100 µL, i.pl.), carragenina (100 µg em 100 µL, i.pl.) ou OVA (25 µg em 100 µL, i.pl., animais CFA-imunizados). A hipernocicepção mecânica foi medida entre 2-24 h e 2-4 dias após a injeção de zimosan ou 1-24 h após as injeções de LPS, carragenina ou OVA.

Também se avaliou a efetividade do pós-tratamento com PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por zimosan. O PMX53 (60 µg em 100 µL, i.pl.) foi administrado 3 dias depois da injeção de zimosan, e a hipernocicepção foi medida 1-24h após da injeção do antagonista. Os grupos de animais

para o ensaio de MPO e determinação de citocinas foram sacrificados 4 h após injeção de zimosan ou 3 h após as injeções de LPS, carragenina ou OVA, como já descrito anteriormente.

Além disso, foi verificado o efeito de PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por zimosan na articulação tíbio-tarsal. Os camundongos foram levemente anestesiados, e zimosan (30 µg em 5 µL) ou TNF-α (100 pg em 5 µL) foi administrado via uma agulha hipodérmica 29 G na região da articulação tíbio-tarsal. Os animais controle receberam uma injeção intra-articular no mesmo volume de salina estéril. Administrou-se, por via subcutânea (s.c.), o PMX53 (0,3, 1 ou 3 mg/Kg) ou seu veículo (salina) 30 min antes da hipernocicepção articular induzida por zimosan, e as respostas comportamentais foram medidas entre 1-7 horas após a indução da hipernocicepção. Ao término da avaliação hipernociceptiva, os animais foram sacrificados e o complexo ósseo tíbio-tarsal foi removido e coletado para o ensaio de MPO.

### **3.7.2 Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica e migração de neutrófilos induzidos por C5a ou Soro Ativado por Zimosan (ZAS)**

Inicialmente, para a determinação da curva dose-resposta de C5a ou de ZAS, os ratos foram tratados com salina (100 µL, i.pl.) e receberam 30 min depois uma injeção de C5a (0,4-40 ng em 100 µL, i.pl.) ou ZAS (diluições de 1:100–1:1000 em 100 µL, i.pl.). Após as doses hipernociceptivas serem determinadas, PMX53 (60 µg em 100 µL, i.pl.) foi administrado seguido da administração de C5a (40 ng em 100 µL, i.pl.) ou de ZAS (diluição 1:300 em 100 µL, i.pl.) 30 min após. As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 h após a injeção intraplantar de C5a ou ZAS. Um grupo de animais foi sacrificado, e o tecido plantar foi coletado 3 h após a injeção de ZAS para a determinação de MPO.

### **3.7.3 Efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por BK, TNF- $\alpha$ , CINC-1, IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e dopamina em ratos**

Nessa etapa de experimentos, o PMX53 (60  $\mu$ g em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou salina (100  $\mu$ L, i.pl.) foi administrado 30 min antes da injeção de BK (500 ng em 100  $\mu$ L, i.pl.), TNF- $\alpha$  (2.5 pg em 100  $\mu$ L, i.pl.), CINC-1 (100 pg em 100  $\mu$ L, i.pl.), IL-1 $\beta$  (0,5 pg em 100  $\mu$ L, i.pl.), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (100 ng em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou dopamina (3  $\mu$ g em 100  $\mu$ L, i.pl.). As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-5 h após a administração dos estímulos hipernociceptivos.

Verificou-se ainda o efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por TNF- $\alpha$  na articulação tíbio-tarsal de camundongos. Os animais foram pré-tratados com PMX53 (3 mg/Kg, s.c.) 30 min antes da hipernociceção mecânica induzida por TNF- $\alpha$  (100 pg em 5  $\mu$ L) na articulação tíbio-tarsal. As respostas hipernociceptivas foram avaliadas entre 1-5 h após a injeção intra-articular de TNF- $\alpha$ .

### **3.7.4 Efeito do sulfato de vimblastina na hipernociceção mecânica e na migração de neutrófilos induzidas por zimosan, C5a ou carragenina**

O sulfato de vimblastina é comumente utilizado em terapias antineoplásicas por exercer um potente efeito de inibição da produção de leucócitos, e é empregado como ferramenta laboratorial para induzir depleção de neutrófilos (BERAY-BERTHAT *et al.*, 2003; DA MOTTA *et al.*, 1994) como a fucoidina (GUERRERO *et al.*, 2008) ou a ciclofosfamida (MENDONÇA *et al.*, 2006).

Com esta finalidade, os animais (ratos) receberam sulfato de vimblastina por via endovenosa (0,8 mg/kg, i.v.) 72 h antes da administração intraplantar de salina (100  $\mu$ L, i.pl.), zimosan (30  $\mu$ g em 100  $\mu$ L, i.pl.), C5a (40 ng em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou carragenina (100  $\mu$ g em 100  $\mu$ L, i.pl.). As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas 1-24 h após a administração intraplantar dos estímulos. Para a contagem de neutrófilos, foram realizados novos grupos de animais que receberam tratamento de sulfato de vimblastina e 72 após receberam estímulo intraplantar (os mesmo descritos acima), foram sacrificados 3 horas após a administração do estímulo e os tecidos foram coletados para o ensaio de

MPO, sendo que suas respostas hipernociceptivas também foram quantificadas 1-3 h com efeito comparativo e comprobatório entre grupos.

### 3.8 Drogas

Os compostos usados neste estudo foram: PMX53 (Peptech/Promics, Toowong, Queensland, Australia), zimosan, C5a, carragenina, LPS, CFA, OVA, BK, dopamina, IL-1 $\beta$ , CINC-1, PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e TNF- $\alpha$  (National Institute for Biological Standards and Control, UK). Todos os compostos foram dissolvidos em salina estéril (HalexIstar, São Paulo, Brasil) exceto para PGE<sub>2</sub>, que foi dissolvido em DMSO (dimetil-sulfóxido, Sigma-Aldrich, 0,2% em salina).

### 3.9 Análise Estatística

Todos os resultados estão apresentados como médias  $\pm$  Erro Padrão das Médias (E.P.M.) para grupos de 3-6 animais. O teste-t foi usado para comparações entre dois grupos não-pareados e a análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) seguido de comparações múltiplas de Bonferroni quando se comparou vários grupos entre si. O nível de significância foi determinado para  $P < 0,05$ .

## ***4. RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Participação do fator C5a na hipernocicepção mecânica inflamatória

No presente trabalho, foi possível verificar a importância do C5a na participação do processo hipernociceptivo inflamatório através da utilização de um potente antagonista seletivo do receptor C5a, o PMX53. As doses inflamatórias do estímulo usado para induzir a hipernocicepção foram previamente determinadas (CUNHA *et al.*, 1991, 1992; FERREIRA *et al.*, 1988, 1993) exceto para o zimosan, o soro ativado por zimosan (ZAS) e o C5a na pata de rato que foram determinados neste trabalho (Figuras 7, 9 e 10 respectivamente). Observou-se que o tratamento local (i.pl.) com o PMX53 (60 e 180 µg/pata, 30 minutos antes da administração de zimosan) inibiu a hipernocicepção mecânica induzida por zimosan (Figura 8). Verificou-se que o pré-tratamento com uma única dose de PMX53 conseguiu promover a anti-hipernocicepção que durou por, pelo menos, 6 horas, verificando-se que o efeito hipernociceptivo restabelece após 24 h. A administração local de PMX53 (60 µg/pata) não alterou as linhas de base nociceptiva dos animais (Figura 8).

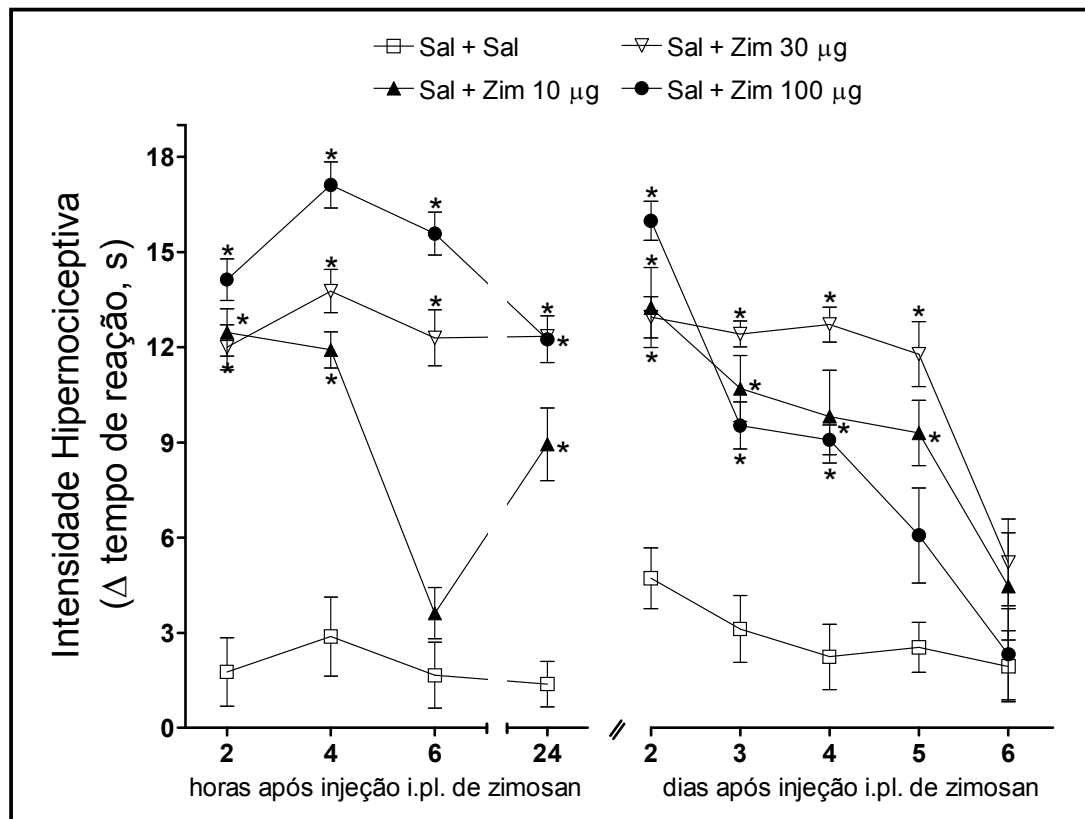
Uma única injeção intraplantar de zimosan foi capaz de induzir uma hipernocicepção mecânica sustentada por até 5 dias. Isso permitiu que se verificasse o efeito do pós-tratamento de PMX53. Foi visto que o tratamento terapêutico com PMX53 (60 µg/pata, administrado 3 dias após a injeção de zimosan) de forma significativa reduziu a hipernocicepção mantida por zimosan, sugerindo que C5a além de participar do início do processo hipernociceptivo inflamatório, também está contribuindo para manter a resposta comportamental sustentada induzida por zimosan (Figura 8). Um grupo que recebeu pré-tratamento de PMX53 (30 min antes do zimosan), após dia 3, foi novamente tratado com PMX53, mesmo após a hipernocicepção mecânica induzida por zimosan ter sido restaurada após dia 2, o PMX53 (60 µg/pata) foi capaz também de inibir essa hipernocicepção (dado não mostrado).

A incubação do soro fresco de rato com zimosan para induzir a ativação do sistema complemento e conseqüente formação de C5a, é uma técnica já bem estabelecida na literatura

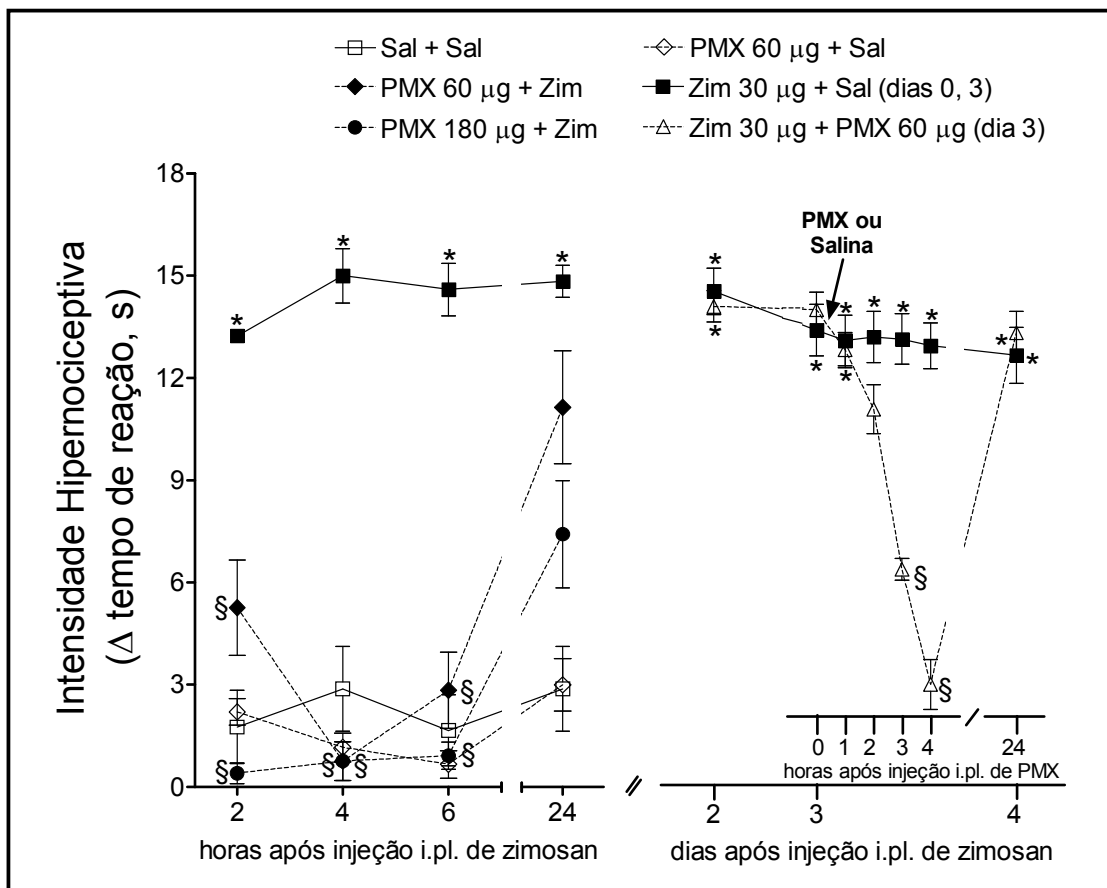


(ISSEKUTZ; MIYASAKA; ISSEKUTZ, 1996; KODANI *et al.*, 2000). Assim, para confirmarmos se o PMX53 está atuando diretamente por bloqueio específico do receptor para o C5a ou da sua via, avaliou-se o efeito de PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por ZAS (Figura 9) ou pelo próprio C5a (Figura 10). O pré-tratamento com PMX53 inibiu a hipernocicepção induzida por ambos os estímulos (Figuras 9 e 10). E ainda, o efeito anti-hipernociceptivo de PMX53 (60 µg/pata) também foi observado na hipernocicepção mecânica induzida por LPS (0,5 µg/pata) ou carragenina (100 µg/pata) (Figura 11). A carragenina e o LPS têm sido amplamente utilizados para se estudar os mecanismos da resposta hipernociceptiva inflamatória periférica inata. Sabe-se que o sistema complemento também participa da inflamação imune adaptativa (SCHLEIMER, 2004). Corroborando essa evidência, o pré-tratamento com PMX53 (60 µg/pata) foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica induzida pelo antígeno (OVA) em animais previamente imunizados (Figura 12). Dessa maneira, estes resultados sugerem que o C5a também participa da gênese da hipernocicepção durante a resposta inflamatória inata e adaptativa.

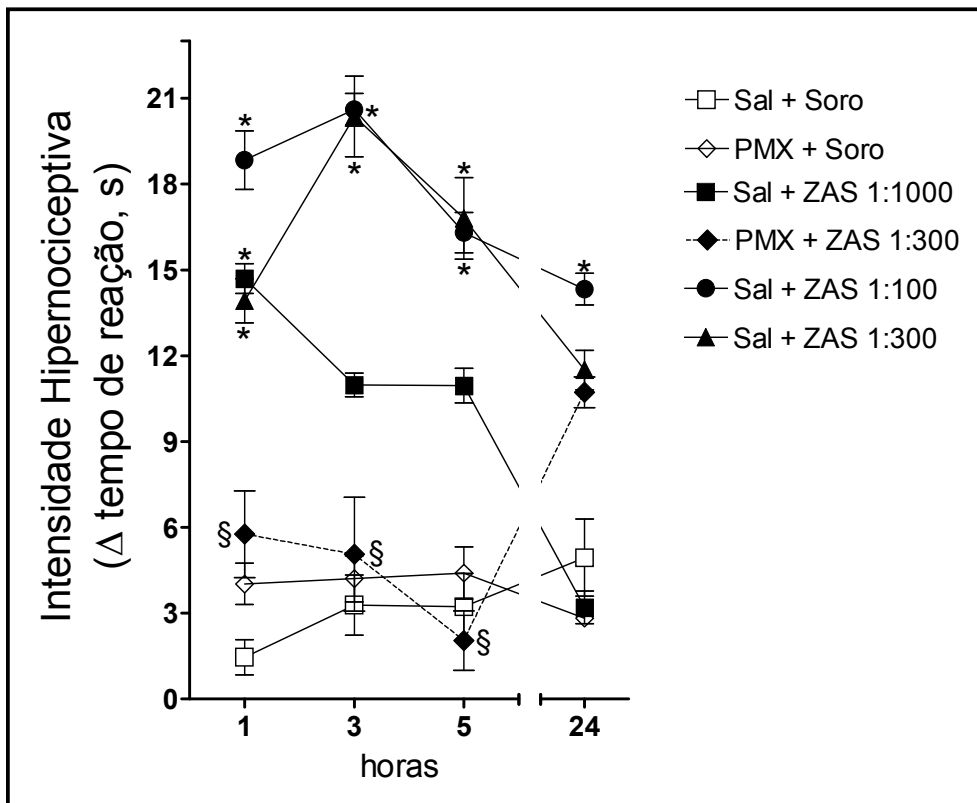
Com o propósito de excluir a hipótese do bloqueio direto da hipernocicepção por um mecanismo que independe do antagonismo do receptor de C5a, analisou-se o efeito do PMX53 na hipernocicepção induzida por mediadores que atuam diretamente no nociceptor (prostaglandinas e aminas simpatomiméticas). Estes mediadores, como já mencionado na introdução, são mediadores de ação direta sobre o receptor de membrana da fibra nociceptiva primária (nociceptor) e que são capazes de promover a sua sensibilização. Assim, os resultados mostraram que o PMX53 não foi capaz de alterar as respostas hipernociceptivas induzidas por PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata) ou dopamina (3 µg/pata) (Figura 13), o que confirma a nossa hipótese de que o PMX53 está antagonizando diretamente e seletivamente o receptor de C5a para o bloqueio da hipernocicepção inflamatória.



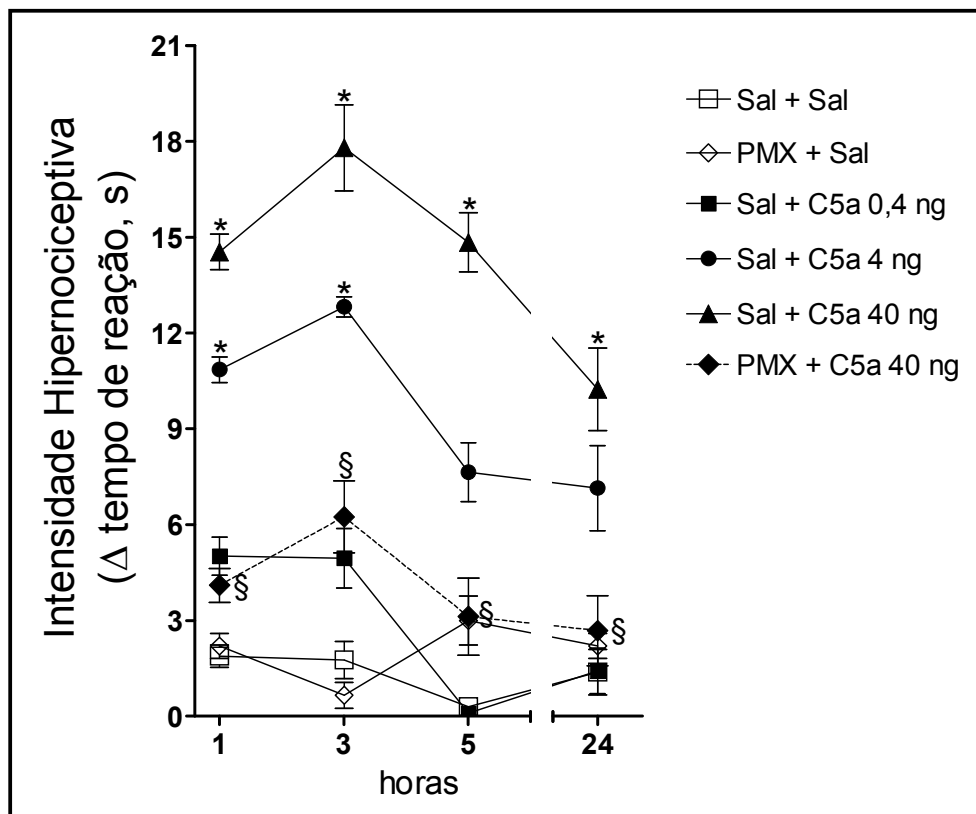
**Figura 7 – Efeito da hipernociceção mecânica induzida por zimosan.** Zimosan (Zim, 10, 30 ou 100  $\mu\text{g}$ , em 100  $\mu\text{L}$ , i.pl.) foi administrada 30 minutos após a injeção de salina (Sal, 100  $\mu\text{L}$ , i.pl.). As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 2-24 h após e dias 2-6 após a injeção intraplantar de zimosan. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparados com animais tratados com salina.



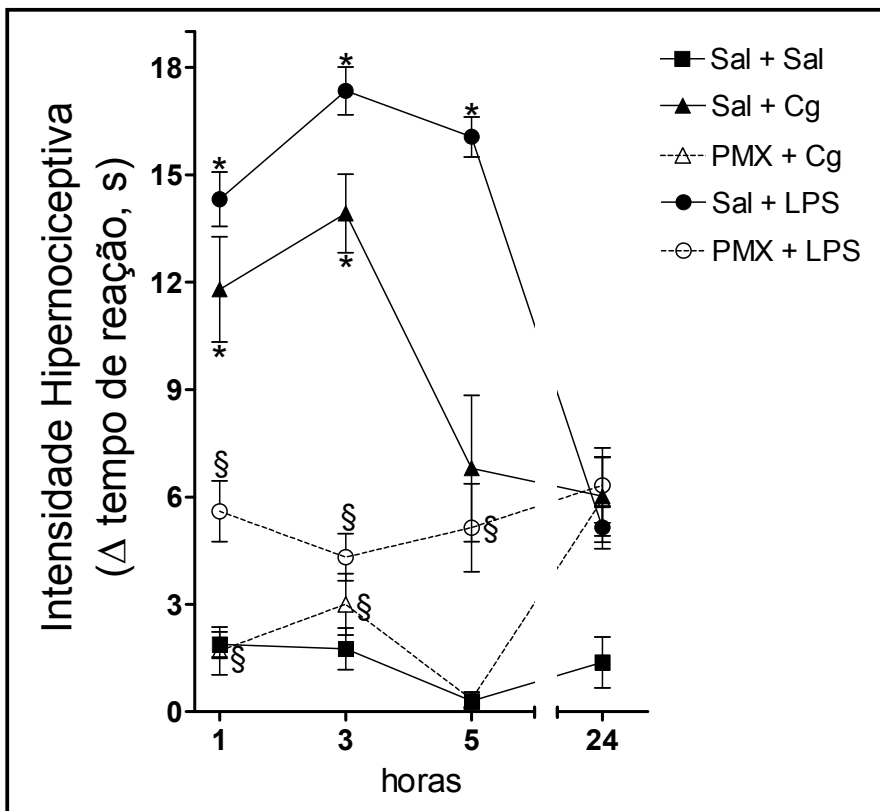
**Figura 8 – Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por zimosan.** PMX 53 (PMX, 60 ou 180  $\mu\text{g}$ , i.pl.) foi administrado 30 minutos antes da injeção de zimosan (Zim, 30  $\mu\text{g}$ , i.pl.) e as respostas hipernociceptivas foram medidas entre 2-24 h. PMX53 (PMX, 60  $\mu\text{g}$ , i.pl.) ou salina também foi administrada no dia 3 após a injeção de zimosan e a hipernocicepção foi avaliada 1-24 h após o tratamento de PMX53. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com salina; §  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com zimosan.



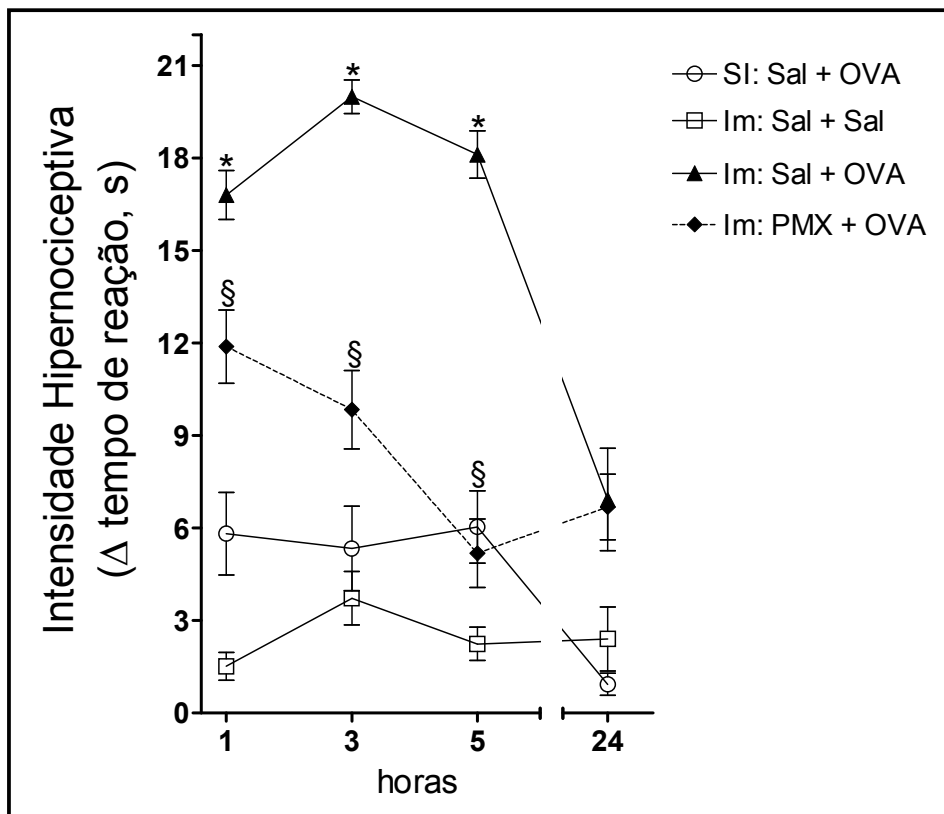
**Figura 9 – Efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por soro ativado por zimosan (ZAS).** Soro ativado por zimosan (ZAS, diluições 1:100, 1:300 ou 1:1000, i.pl.) ou soro inativo (Soro, 100  $\mu$ L, i.pl.) foi administrado 30 minutos após a injeção de salina (Sal, 100  $\mu$ L, i.pl.) e as respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 h após. PMX 53 (PMX, 60  $\mu$ g, i.pl.) foi administrado 30 minutos antes da injeção do soro ativado (ZAS, 1:300, i.pl.) e as respostas hipernociceptivas foram medidas entre 1-24 h. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com Sal + Soro; §  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratado com Sal + ZAS 1:300.



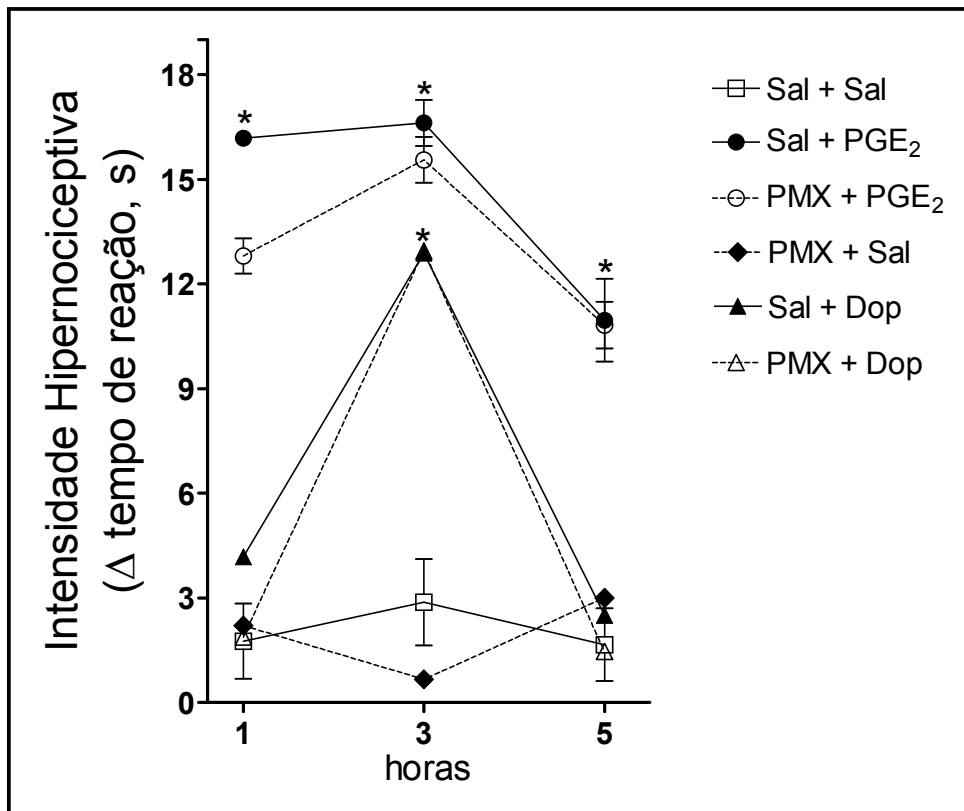
**Figura 10 – Efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por C5a.** O C5a (C5a, 0,4, 4 ou 40 ng, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou salina (Sal, 100  $\mu$ L, i.pl.) foi administrado 30 minutos após a injeção de salina (Sal, 100  $\mu$ L, i.pl.), as respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 h após. PMX 53 (PMX, 60  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) foi administrado 30 minutos antes da injeção do C5a (C5a, 40 ng, em 100  $\mu$ L, i.pl.) e as respostas hipernociceptivas foram medidas entre 1-24 h. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com Sal + Sal; §  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratado com Sal + C5a 40 ng.



**Figura 11 – Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina ou por lipopolissacarídeo.** PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou salina (Sal, 100  $\mu$ L, i.pl.) foi injetado 30 minutos antes do lipopolissacarídeo (LPS, 0,5  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou carragenina (Cg, 100  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.), as respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 h após. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com Sal + Sal; §  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratado com Sal + estímulo.



**Figura 12 – Efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por antígeno (OVA) em animais imunizados.** Ovo albumina (OVA, 25  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) foi administrado 30 minutos após a injeção de PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, ip.l.) ou salina (Sal, 100 $\mu$ L, i.pl.) em ratos previamente imunizados conforme descrito em Material e Métodos. As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 h após. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais Sham-Imunizados (SI: Sal + OVA); §  $P < 0,05$  quando comparado a animais Imunizados (Im) tratado com Sal + OVA.



**Figura 13 – Efeito do PMX53 na hipernocicepção mecânica induzida por Prostaglandina E<sub>2</sub> ou por Dopamina.** PMX53 (PMX, 60 µg, em 100 µL, i.pl.) ou salina (Sal, 100 µL, i.pl.) foi injetado 30 minutos antes da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 100 ng, em 100 µL, i.pl.) ou dopamina (Dop, 3 µg, em 100 µL, i.pl.), as respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-5 h após. Os resultados estão expressos como médias ± E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com Sal + Sal.



#### **4.2 O C5a não interfere na liberação da cascata de citocinas hipernociceptivas**

Já foi demonstrado anteriormente por Ferreira, Lorenzetti e Poole (1993) que a hipernocicepção mecânica inflamatória é mediada por uma cascata de citocinas, e esta é iniciada pela liberação de bradicinina, seguindo-se por TNF- $\alpha$ , como já descrito na introdução. Diante disso, um dos objetivos deste trabalho foi verificar se o efeito anti-hipernociceptivo de PMX53 seria dependente da inibição de síntese dessas citocinas. Entretanto, o pré-tratamento local com PMX53 (60  $\mu\text{g/pata}$ ), na dose capaz de inibir a hipernocicepção, não conseguiu diminuir a liberação de TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  quando se administrou zimosan (30  $\mu\text{g/pata}$ ), LPS (0,5  $\mu\text{g/pata}$ ) ou carragenina (100  $\mu\text{g/pata}$ ) (Tabela 1). Esses resultados sugerem que a inibição da produção de citocinas não seria o principal mecanismo envolvido no efeito anti-hipernociceptivo mecânico do PMX53.

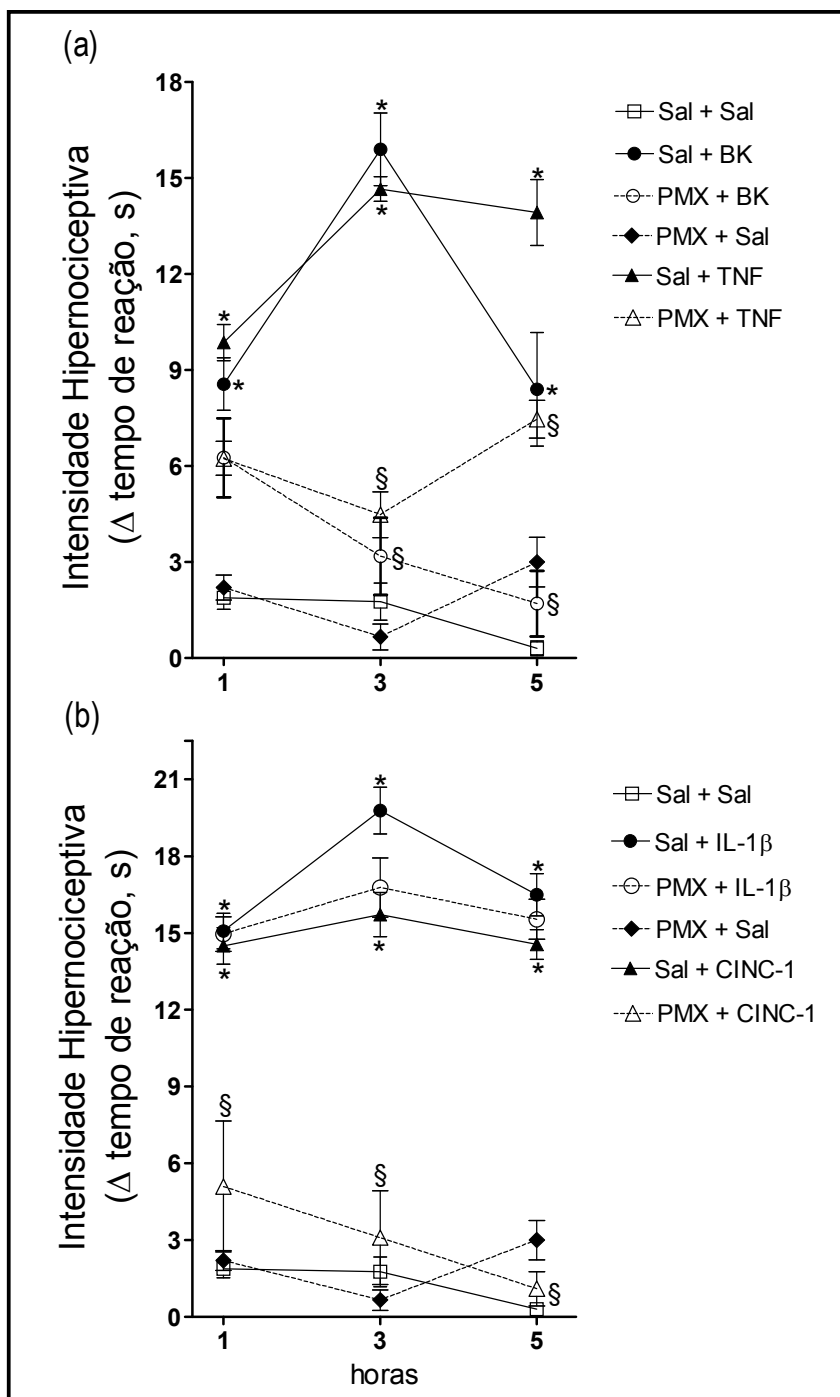
**Tabela 1 – Efeito da administração local do PMX53 no aumento dos níveis tissulares de citocina induzida por zimosan, carragenina ou lipopolissacarídeo**

Tratamento	Citocina (pg/pata)	
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
Sal + Sal	25 $\pm$ 2	322 $\pm$ 28
PMX + Sal	18 $\pm$ 1	257 $\pm$ 21
Sal + Zim	34 $\pm$ 4 *	501 $\pm$ 27 *
PMX + Zim	37 $\pm$ 3	480 $\pm$ 19
Sal + Cg	42 $\pm$ 4 *	531 $\pm$ 16 *
PMX + Cg	42 $\pm$ 2	458 $\pm$ 35
Sal + LPS	63 $\pm$ 4 *	608 $\pm$ 8 *
PMX + LPS	79 $\pm$ 5	611 $\pm$ 14

Os animais foram pré-tratados com injeção de salina (100  $\mu$ g, i.pl.) ou PMX53 (PMX60  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) 30 minutos antes da injeção de zimosan (Zim, 30  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.), carragenina (Cg, 100  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou lipopolissacarídeo (LPS, 0,5  $\mu$ g, em 100  $\mu$ L, i.pl.). O tecido plantar foi coletado 3 horas após a injeção i.pl. de zimosan, carragenina ou LPS, e os níveis de citocina (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) foram determinados por ELISA. Os dados estão expressos como Médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado com grupo controle salina (Sal + Sal); n=3 – 4.

### 4.3 O C5a participa da hipernocicepção induzida por citocinas

Considerando que o C5a não medeia a liberação de citocinas durante a hipernocicepção inflamatória, o passo seguinte foi determinar se está envolvido na mediação do efeito hipernociceptivo induzido por BK e subsequente cascata de citocinas. Para verificar esta hipótese, os animais (ratos) foram pré-tratados com PMX53 (60 µg/pata) 30 minutos antes da injeção intraplantar de BK (500 ng/pata, Figura 14a), TNF-α (2,5 pg/pata, Figura 14a), IL-1β (0,5 pg/pata, Figura 14b) ou CINC-1 (100 pg/pata, Figura 14b). A hipernocicepção mecânica foi avaliada 1-5 horas após a administração dos estímulos. As doses dessas citocinas utilizadas para induzir hipernocicepção mecânica foram determinadas anteriormente conforme mencionado (CUNHA *et al.*, 1991, 1992; FERREIRA *et al.*, 1988, 1993; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993). Como pode ser observado nas Figuras 14a e 14b, o pré-tratamento com PMX53 foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica induzida por BK, TNF-α ou CINC-1, mas não por IL-1β.

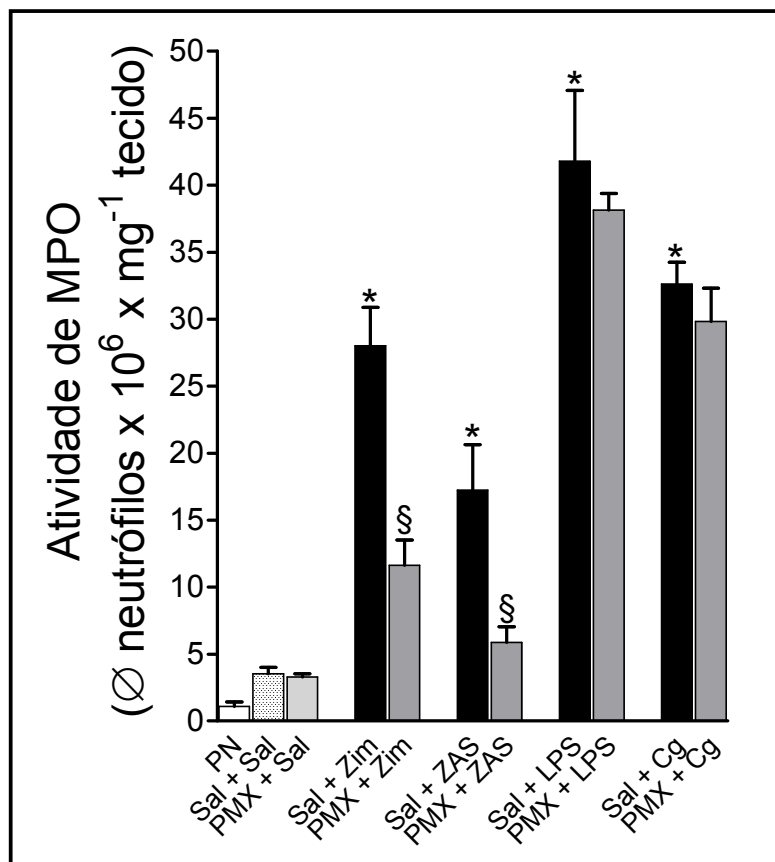


**Figura 14 – Efeito do PMX53 na hipernociceção mecânica induzida por Bradicina, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , Interleucina-1 $\beta$  ou CINC-1.** PMX53 (PMX, 60  $\mu$ L, i.pl.) ou salina (Sal, 100  $\mu$ L, i.pl.) foi injetado 30 minutos antes da injeção de **(a)** bradicina (BK, 500 ng, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF, 2,5 pg, em 100  $\mu$ L, i.pl.); **(b)** interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 0,5 pg, em 100  $\mu$ L, i.pl.) ou CINC-1 (CINC-1, 100 pg, em 100  $\mu$ L, i.pl.). As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-5 h após. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com Sal + Sal; §  $P < 0,05$  quando comparado a animais tratado com Sal + estímulo.

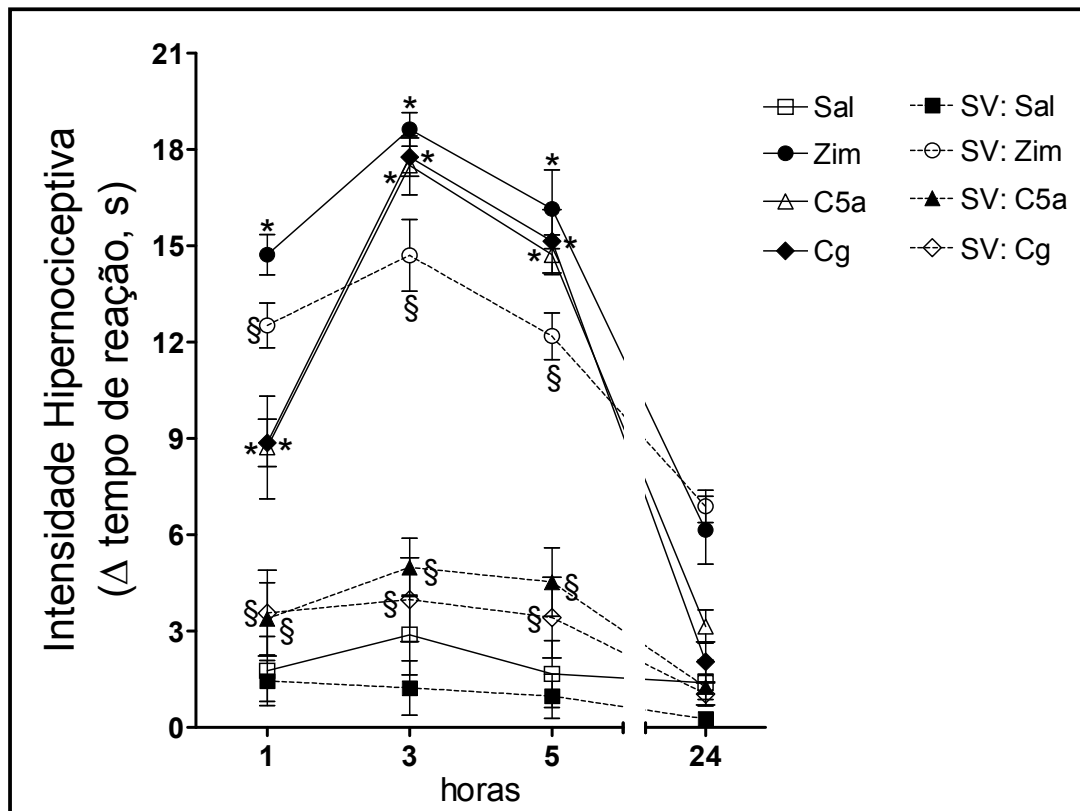
#### 4.4 A participação de neutrófilos na hipernocicepção inflamatória induzida por C5a

Conforme demonstrado anteriormente, o C5a exerce um papel na migração de neutrófilos em vários modelos inflamatórios. Adicionalmente, Levine *et al.* (1985) mostrou uma relação de dependência da migração de neutrófilo com o efeito hipernociceptivo do C5a, e que os neutrófilos exercem um papel importante na gênese da hipernocicepção inflamatória. Dessa forma, o presente trabalho verificou se o C5a medeia a hipernocicepção inflamatória interferindo com o mecanismo de recrutamento de neutrófilos. Para avaliar esta hipótese, os ratos foram tratados com C5a (60 µg/pata) ou salina (100 µL/pata) 30 minutos antes da administração intraplantar de zimosan, ZAS, LPS ou carragenina. Após três horas da injeção do estímulo, os tecidos subcutâneos da pata do rato foram coletados para o ensaio da atividade de MPO (Figura 15). Esse método é usado para se determinar indiretamente a quantidade de neutrófilos presentes (BRADLEY *et al.*, 1982). O tratamento com PMX53 reduziu parcialmente a migração de neutrófilos induzida por zimosan, ZAS e C5a (Figura 15). Embora os neutrófilos pareçam ser importantes na gênese da hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e LPS, foi visto que PMX53 não reduziu a migração de neutrófilos diante destes dois estímulos (Figura 15). É possível que o C5a ao invés de comprometer o recrutamento de neutrófilos, poderia ativar estas células na inflamação induzida por LPS e carragenina.

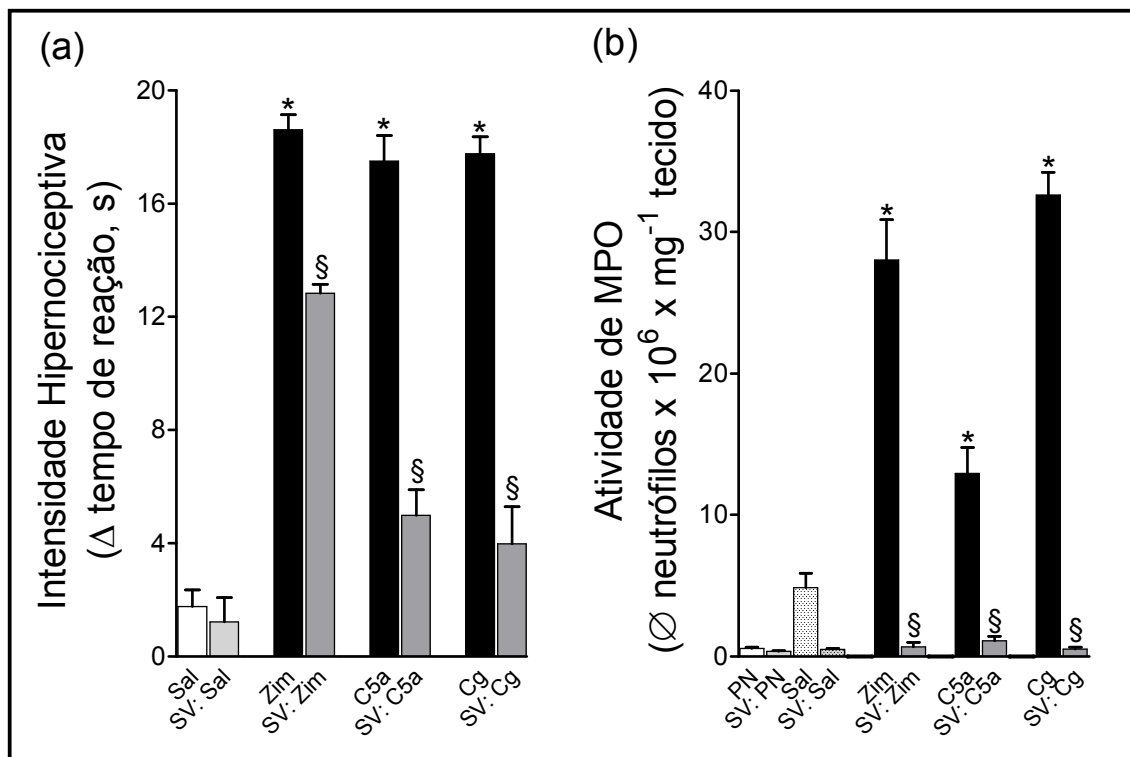
Sustentando a hipótese de que neutrófilos são importantes para a gênese da hipernocicepção inflamatória, a depleção de neutrófilos pela administração de sulfato de vimblastina (tratamento prévio de 72 horas antes do desafio), foi capaz de reduzir significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por zimosan, C5a ou carragenina 1-24 horas após a administração dos estímulos (Figura 16) e 3 horas após (Figura 17a). O tratamento dos ratos com sulfato de vimblastina ainda aboliu a migração de neutrófilos induzida por estes mesmos estímulos (Figura 17b).



**Figura 15 – O PMX53 inibe migração de neutrófilos induzida por Zimosan, Soro Ativado por Zimosan, mas não pela migração induzida por LPS ou Carragenina.** Os ratos foram pré-tratados com PMX53 (PMX, 60 µg, i.pl.) ou salina (Sal, 100 µL, i.pl.) 30 minutos antes da injeção intraplantar de salina (100 µL, i.pl.), zimosan (30 µg, i.pl.), soro ativado por zimosan (ZAS, diluição de 1:300, i.pl.), lipopolissacarídeo (LPS, 0,5 µg, i.pl.) ou carragenina (Cg, 100 µg, i.pl.), e o tecido plantar do animal foi coletado a 4 horas após a administração de zimosan ou a 3 horas após a injeção de ZAS, LPS ou carragenina, para o ensaio da atividade mieloperoxidase (MPO) (ver Material e Métodos). As amostras sem tratamento (PN) são os controles do ensaio. Os resultados estão expressos como médias ± E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Sal + Sal); §  $P < 0,05$  quando comparado com os respectivos grupos tratados com estímulo hipernociceptivo;  $n=4$ .



**Figura 16 – Efeito da depleção de neutrófilos por Sulfato de Vimblastina na hipernociceção mecânica induzida por Zimosan, C5a ou Carragenina.** Os ratos foram pré-tratados com sulfato de vimblastina (SV, 0,8 mg/Kg, i.v.) 72 horas antes da injeção de salina (Sal, 100 µL, i.pl.), zimosan (Zim, 30 µg, em 100 µL, i.pl), C5a (C5a, 40 ng, em 100 µL, i.pl.) ou carragenina (Cg, 100 µg, em 100 µL, i.pl.). As respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas antes dos animais serem tratados com sulfato de vimblastina (t = 0 h) e no dia do experimento, antes de se iniciar as injeções intraplantares para certificar de que a vimblastina não estaria alterando o limiar nociceptivo dos animais, em seguida, as respostas hipernociceptivas mecânicas foram avaliadas entre 1-24 horas após a administração dos estímulos nociceptivos. Os resultados estão expressos como médias ± E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Sal); §  $P < 0,05$  quando comparado aos grupos tratados com os respectivos estímulos sem o prévio tratamento com sulfato de vimblastina.

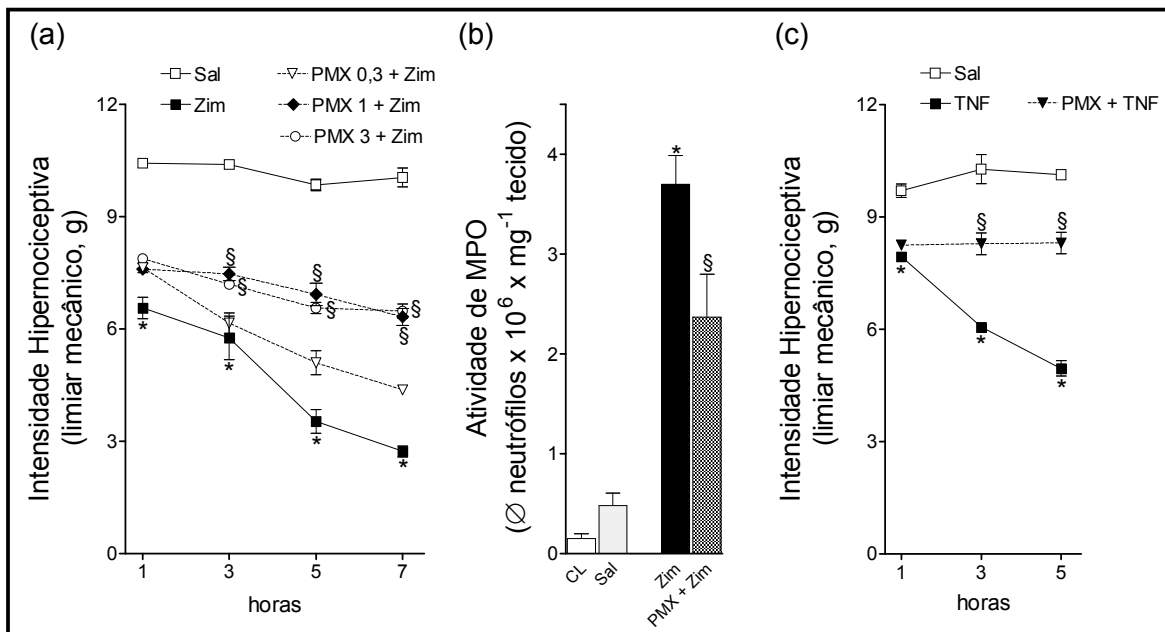


**Figura 17 – Depleção de neutrófilos induzida por Sulfato de Vimblastina diminui a hipernociceção mecânica induzida por zimosan, C5a ou Carragenina. (a)** As respostas hipernociceptivas foram avaliadas no tempo 3 horas após a administração dos estímulos zimosan (Zim, 30  $\mu\text{g}$ , em 100  $\mu\text{L}$ , i.pl.), C5a (C5a, 40 ng, em 100  $\mu\text{L}$ , i.pl.) ou carragenina (Cg, 100  $\mu\text{g}$ , em 100  $\mu\text{L}$ , i.pl.). **(b)** Após a medição das respostas comportamentais, imediatamente, os animais foram sacrificados para a coleta do tecido plantar e a determinação da atividade mieloperoxidase (MPO). As amostras dos tecido sem tratamento (patas normais) compõem o grupo de controle do ensaio para a atividade de MPO. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Sal);  $\S$   $P < 0,05$  quando comparado a animais tratados com os respectivos estímulos sem o prévio tratamento com sulfato de vimblastina.



#### **4.5 A participação do C5a na gênese da hipernocicepção mecânica articular induzida por zimosan ou TNF- $\alpha$ em camundongo**

Para conceituar ainda melhor a importância do C5a para a hipernocicepção inflamatória, utilizando-se outro modelo de hipernocicepção mecânica, foi verificado o efeito de PMX53 na hipernocicepção articular induzida pela administração de zimosan ou TNF- $\alpha$  na articulação tíbio-tarsal de camundongo. Observou-se que o pré-tratamento sistêmico do PMX53 (0,3-3 mg/Kg, s.c.) reduziu a hipernocicepção articular induzida por zimosan ou TNF- $\alpha$  (Figuras 18a e 18c, respectivamente). O tratamento prévio de PMX53 (3 mg/Kg, s.c., 30 minutos antes) também foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a articulação tíbio-tarsal de camundongo (Figura 18b).



**Figura 18 – PMX53 inibe a hipernociceção mecânica induzida na articulação tíbio-tarsal de camundongos.** (a) PMX53 (PMX, 0,3-3 mg/Kg, s.c.) ou salina (Sal) foi injetado subcutaneamente (tratamento sistêmico) 30 minutos antes da injeção intra-articular de zimosan (Zim, 30  $\mu$ g em 5  $\mu$ L), e a resposta hipernociceptiva foi medida entre 1-7 horas após a administração do zimosan. (b) A articulação tíbio-tarsal foi coletada 7 horas após a injeção intra-articular de zimosan (Zim, 30  $\mu$ g em 5  $\mu$ L) ou salina (Sal, 5  $\mu$ L) para a determinação da atividade de MPO. A articulação contralateral (CL), sem tratamento, é o controle do ensaio para atividade de MPO. (c) PMX53 (PMX 3 mg/Kg, s.c.) ou salina (Sal) foi administrado 30 minutos antes da injeção intra-articular de TNF- $\alpha$  (TNF, 100 pg em 5  $\mu$ L), e as respostas hipernociceptivas foram avaliadas entre 1-5 horas após a injeção de TNF- $\alpha$ . Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M., sendo \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (Sal); §  $P < 0,05$  quando comparado aos animais tratados com estímulo (Zim ou TNF).

## ***5. DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se pela primeira vez, que o C5a endógeno está envolvido na gênese da resposta hipernociceptiva mecânica, e que o PMX53, um antagonista seletivo do receptor C5a, exerce um efeito anti-hipernociceptivo mecânico periférico extremamente marcado em diferentes modelos inflamatórios, tanto em ratos quanto em camundongos. A atividade hipernociceptiva do C5a parece não estar ligada ao acionamento da cascata de citocinas hipernociceptivas. Ao contrário, o C5a contribui para o efeito hipernociceptivo dessas citocinas. Por fim, os resultados deste trabalho demonstraram ainda que neutrófilos estão envolvidos no efeito hipernociceptivo de C5a.

A participação do sistema complemento em diversas condições inflamatórias tem sido demonstrada extensivamente (ARUMUGAM *et al.*, 2004; HAWLISCH *et al.*, 2004; LINTON; MORGAN, 1999; WARD, 2004). Inicialmente, os constituintes do sistema complemento foram considerados mediadores principais da resposta imune inata devido à sua capacidade de aumentarem a fagocitose e conseqüentemente a defesa do organismo contra patógenos (VAN BEEK; ELWARD; GASQUE, 2003). Posteriormente, também foi demonstrada a participação do complemento na fisiopatologia inflamatória de uma variedade de doenças agudas e crônicas. O sistema complemento, especialmente o fator C5a desempenha um papel crucial no recrutamento e ativação de neutrófilos e também de outros leucócitos frente a diferentes modelos de inflamação e doenças como a artrite reumatóide (WEISSMANN, 2006; WOODRUFF *et al.*, 2002). Todavia, o papel hipernociceptivo do C5a ainda não está totalmente elucidada. Em um dos estudos pioneiros que investigaram a atividade hipernociceptiva do C5a, Levine *et al.* (1985) demonstraram que a injeção i.pl. (intradérmica) de C5a em ratos induziu a hipernocicepção mecânica. No presente trabalho, através da utilização do antagonista seletivo para o receptor C5a (PMX53), foi demonstrado que a ativação deste receptor pelo C5a medeia a hipernocicepção mecânica induzida por zimosan (conseqüentemente o seu derivado do soro – ZAS, bem como o próprio C5a), carragenina, LPS ou antígeno (OVA). Como era esperado, o PMX53 foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica induzida por zimosan, ZAS e C5a, mas não afetou as respostas induzidas

pela PGE<sub>2</sub> ou dopamina. Estes resultados confirmam que o efeito anti-hipernociceptivo do PMX53 é decorrente do antagonismo seletivo dos receptores para C5a. O uso terapêutico (pós-tratamento) de PMX53, que também inibiu a hipernocicepção sustentada induzida por zimosan, é um resultado bastante relevante, sugerindo que a liberação endógena de C5a está envolvida na manutenção da hipernocicepção prolongada induzida por zimosan. O perfil da atividade desta nova droga sugere um grande potencial do uso terapêutico de antagonistas do receptor para o C5a para se controlar a dor crônica inflamatória. Corroborando essa idéia, Woodruff *et al.* (2002) utilizou PMX53, por via oral, para o tratamento da artrite experimental em ratos e seus resultados mostraram uma melhora pronunciada na patologia. Nesse estudo, verificou-se que os animais tratados com PMX53, os joelhos artríticos induzidos experimentalmente apresentaram uma significativa redução no edema, melhora no andar (manquejar), diminuição da quantidade de células migradas para a articulação e uma redução também no perfil patológico do infiltrado inflamatório examinado através de cortes histológicos da articulação. Observou-se também uma redução dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  intra-articulares e de níveis séricos de TNF- $\alpha$  circulante. Embora a dor inflamatória seja um dos sintomas mais importantes da artrite reumatóide, o efeito antinociceptivo de PMX53 foi pouco abordado nesse estudo. Já no presente estudo, foi demonstrado que o tratamento com PMX53 inibiu, de forma dose-dependente, a hipernocicepção no modelo de artrite induzida por zymosan ou por TNF- $\alpha$ , bem como a redução da migração de neutrófilos em camundongos. Em concordância com as nossas conclusões, estudo recente mostrou que o tratamento sistêmico com PMX53, em camundongos, reduziu a hipernocicepção em um modelo experimental de dor pós-cirúrgica, nocicepção por lesão incisional (CLARK *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que a hipernocicepção inflamatória é mediada por uma cascata de citocinas iniciada por BK (BK desencadeia TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  IL-6  $\rightarrow$  IL-1 $\beta$   $\rightarrow$  PGE<sub>2</sub>; e TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  IL-8/CINC-1  $\rightarrow$  aminas simpatomiméticas) (CUNHA *et al.*, 1991,1992; FERREIRA *et al.*, 1993; VERRI JR *et al.*, 2006). Considerando que o C5a induz a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e quimiocinas (LAUDES *et al.*, 2002; O'BARR; COOPER, 2000) e que PMX53 inibe a produção

de citocinas no modelo experimental de dor pós-cirúrgica por lesão incisional (CLARK *et al.*, 2006), bem como no modelo experimental de artrite reumatóide (WOODRUFF *et al.*, 2002), o presente trabalho investigou se o efeito anti-hipernociceptivo de PMX53 dependeria da inibição da produção de citocinas. Numa dose em que inibe significativamente a hipernocicepção, o PMX53 não alterou os níveis de produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzida por LPS, carragenina ou zimosan. De acordo com esses resultados, parece que o potente efeito anti-hipernociceptivo do PMX53 independe da produção de citocinas. É importante lembrar que há também evidências na literatura que C5a não induz diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (HAYNES *et al.*, 2000). Na realidade, o C5a *per se* não conseguiu induzir a liberação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 a partir de monócitos humanos (HAYNES *et al.*, 2000). Uma possível explicação para esses dados contraditórios seria a diferença entre os modelos experimentais utilizados.

A incapacidade do C5a para induzir ativação da cascata de citocinas hipernociceptivas nos levou a testar se ele poderia estar mediando os efeitos hipernociceptivos destas citocinas. Foi observado que o PMX53 reduziu a hipernocicepção mecânica induzida por BK (que atua através da liberação de citocinas, mencionado anteriormente), por TNF- $\alpha$ , e por CINC-1. Contudo, o PMX53 não foi capaz de inibir a hipernocicepção induzida por IL-1 $\beta$ . Isso sugere que o papel de C5a na hipernocicepção inflamatória se encaixa em uma posição abaixo da cascata de citocinas descrita. A incapacidade de PMX53 inibir a hipernocicepção induzida por IL-1 $\beta$  é esperada, uma vez que essa citocina induz hipernocicepção diretamente através da produção de prostanóides via COX (FERREIRA *et al.*, 1988, 1997).

Este grupo e outros mostraram que a migração de neutrófilos para sítios inflamatórios e/ou a sua ativação exerce um papel fundamental na gênese da hipernocicepção inflamatória (CUNHA *et al.*, 2008; DE ABREU CASTRO; FERREIRA, 1979; LAVICH *et al.*, 2006; LEVINE *et al.*, 1985). Recentemente, nosso grupo demonstrou que os neutrófilos, ao invés de serem responsáveis por iniciar a cascata de citocinas, são cruciais para que estas últimas induzam hipernocicepção (CUNHA *et al.*, 2008). Neste sentido, e em concordância com o estudo anterior (LEVINE *et al.*, 1985), foi observado, no

presente estudo, que o efeito hipernociceptivo do C5a está associado com a presença de neutrófilos, pois seu efeito hipernociceptivo foi reduzido (93% em comparação com o grupo controle) através da depleção de neutrófilos em ratos tratados com sulfato de vimblastina. O tratamento com sulfato de vimblastina também reduziu a hipernocicepção induzida por carragenina ou por zimosan, confirmando a participação dos neutrófilos no início do processo hipernociceptivo. Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho e os dados dos estudos com modelos de doença inflamatória (artrite reumatóide) e isquemia por reperfusão, pode-se atribuir que a eficácia do PMX53 está intimamente relacionada com a inibição da migração de neutrófilos ou à diminuição da sua atividade (WOODRUFF *et al.*, 2003). Por isso, examinamos se o efeito antinociceptivo do PMX53 seria uma consequência da inibição do acúmulo de neutrófilos. Foi visto que o PMX53 reduziu a migração de neutrófilos induzida por zimosan, ZAS ou C5a, mas não aquela induzida por carragenina ou LPS. Primeiramente, estes resultados confirmam que o principal mediador presente em ZAS gerado *in vivo* após administração de zimosan e que medeia a migração de neutrófilos é o C5a, enquanto que outros mediadores quimiotáticos poderiam estar participando do recrutamento de neutrófilos nos modelos de carragenina e LPS. Por exemplo, alguns estudos mostraram que TNF- $\alpha$ , leucotrieno B<sub>4</sub> e quimiocinas medeiam a migração de neutrófilos induzidas por estes estímulos inflamatórios (DA ROCHA *et al.*, 2004; VALE *et al.*, 2004). Em segundo lugar, os resultados também sugerem que o efeito antinociceptivo do PMX53 não é principalmente devido à inibição do processo de migração. Assim, embora o recrutamento de neutrófilos seja essencial para a gênese da hipernocicepção inflamatória, na ausência de sua ativação por C5a, a hipernocicepção não é desencadeada embora estejam presentes no foco inflamatório. É possível que o C5a produzido no foco inflamatório ative os neutrófilos recrutados para produzir produtos permissivos à hipernocicepção, produtos estes que ainda estão para ser definidos (CASTELLHEIM *et al.*, 2005; HETLAND *et al.*, 1998). Há indícios de que a ativação de neutrófilos leva à produção de prostaglandinas e de 15-HETE, que também desencadeiam a hipernocicepção (AKAMA *et al.*, 1990; CUNHA *et al.*, 2008; LEVINE *et al.*, 1985). Além disso, a ativação dos receptores C5a nos neutrófilos promove um aumento

brusco no metabolismo celular do oxigênio (*burst* respiratório), com produção de radicais livres e a liberação de grânulos de enzima, o que também poderia estar envolvido no processo de hipernocicepção inflamatória (BAZARGANI, 2005). Embora os neutrófilos pareçam ser as principais células inflamatórias envolvidas no efeito hipernociceptivo do C5a, como mencionado anteriormente, seus receptores são igualmente expressos em outras células imunes, como macrófagos e mastócitos (KIENER *et al.*, 1998; FAYYAZI *et al.*, 1999). Tais células também foram implicadas em uma variedade de modelos de dor crônica (MARCHAND *et al.*, 2005). Portanto, mais estudos serão necessários para investigar se essas células também contribuem direta ou indiretamente para a atividade pró-nociceptiva do C5a.

Além do papel periférico do C5a descrito acima, não podemos descartar a possibilidade de que C5a também poderia participar na gênese da hipernocicepção inflamatória por um efeito sobre o sistema nervoso central. Neste contexto, em um estudo recente, Griffin *et al.* (2007) mostraram que, em vários modelos de dor neuropática, houve um aumento na produção de compostos do sistema complemento pelas células microgliciais da medula espinal. Mais trabalhos sustentam a hipótese de que o sistema complemento exerce um papel na gênese da dor neuropática, mais especificamente o C5a. Foi demonstrado que a ruptura da sinalização do C5, usando-se camundongos deficiente de C5 (nocautes para C5), bem como através do tratamento intratecal com um antagonista C5aR1 (*knockdown*), melhora o quadro de alodinia induzida por lesão do nervo (GRIFFIN *et al.*, 2007). Além disso, neste mesmo estudo mostrou que a administração intratecal de C5a induz alodinia a frio de forma dose-dependente (Griffin *et al.*, 2007).

Em resumo, o presente estudo demonstrou a importância do C5a endógeno na gênese da hipernocicepção mecânica inflamatória em vários modelos e em duas espécies diferentes de animais. Verificou também que a presença do C5a não implica necessariamente à liberação de citocinas hipernociceptivas durante um quadro de hipernocicepção inflamatória, mas quando neutrófilos estão presentes no sítio inflamatório, o C5a parece exercer uma função permissiva à ativação dessas células.



## ***6. CONCLUSÕES***

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho sugerem que: (i) o C5a é um importante componente envolvido na gênese da hipernocicepção mecânica induzida por diferentes estímulos inflamatórios. Portanto, antagonistas dos receptores para o C5a, como PMX53, são drogas promissoras para o manejo da hipernocicepção mecânica que acompanha esses processos; (ii) os neutrófilos parecem contribuir parcialmente para o desenvolvimento da hipernocicepção mecânica induzida pelo C5a; (iii) enquanto que as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  não contribuem.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. O Sistema do Complemento. In: **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2004. p. 327-354.
- AKAMA, H.; ICHIKAWA, Y.; MATSUSHITA, Y.; SHINOZAWA, T.; HOMMA, M. Mononuclear cells enhance prostaglandin E2 production of polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor alpha. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 168: 857-862, 1990.
- ARUMUGAM, T.V.; SHIELS, I.A.; WOODRUFF, T.M.; GRANGER, D.N.; TAYLOR, S.M. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. **Shock**, 21: 401-409, 2004.
- BAZARGANI, F. Acute inflammation in peritoneal dialysis: experimental studies in rats. Characterization of regulatory mechanisms. **Swed. Dent. J. Suppl.**, 1-57, i, 2005.
- BENNETT, G.; AL-RASHED, S.; HOULT, J.H.; BRAIN, S.D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, 77(3): 315-322, 1998.
- BERAY-BERTHAT, V.; CROCI, N.; PLOTKINE, M.; MARGAILL, I. Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. **Brain Res.**, 987(1): 32-38, 2003.
- BERTON, G.; LOWELL, C.A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. **Cell Signal**, 11(9): 621-635, 1999.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, 67(1): 67-186, 1987.
- BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, 30(5): 791-797, 1985.
- BODDEKE, E.W. Involvement of chemokines in pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 429(1-3): 115-119, 2001.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, 78: 206-209, 1982.
- CASTELLHEIM, A.; PHARO, A.; FUNG, M.; SAUGSTAD, O.D.; MOLLNES, T.E. Complement C5a is a key mediator of meconium-induced neutrophil activation. **Pediatr. Res.**, 57: 242-247, 2005.
- CHAHL, L.A.; IGGO, A. The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous afferent nerve activity. **Br. J. Pharmacol.**, 59(2): 343-347, 1977.
- CHENOWETH, D.E.; HUGLI, T.E. Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 75(8): 3943-3947, 1978.

- CLARK, J.D.; QIAO, Y.; LI, X.; SHI, X.; ANGST, M.S.; YEOMANS, D.C. Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression. **Anesthesiology**, 104(6): 1274-1282, 2006.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72(5): 359-371, 2005.
- CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, 104(3):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.**, 107(3): 660-664, 1992.
- CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems – cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 127(3): 671-678, 1999.
- CUNHA, J.M.; SACHS, D.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **Br. J. Pharmacol.**, 139: 1135-1145, 2003.
- CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. In: DeLeo, J.; Sorkin, I.; Watkins, I. (eds). **Immune and Glial Regulation of Pain**. Seattle: IASP Press, 2007.
- CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J. Leukoc. Biol.**, 83(4): 824-832, 2008.
- CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102(5): 1755-1760, 2005.
- CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(3):401-407, 2004.
- DA MOTTA, J.I.; CUNHA, F.Q.; VARGAFTIG, B.B.; FERREIRA, S.H. Drug modulation of antigen-induced paw oedema in guinea-pigs: effects of lipopolysaccharide, tumour necrosis factor and leucocyte depletion. **Br. J. Pharmacol.**, 112(1):111-116, 1994.
- DA ROCHA, F.A.; TEIXEIRA, M.M.; ROCHA, J.C.; GIRAO, V.C.; BEZERRA, M.M.; RIBEIRO RDE, A.; CUNHA, F.Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, 497: 81-86, 2004.
- DE ABREU CASTRO, M.S.; FERREIRA, S.H. Cell Migration and Hyperalgesia: A Paradoxical Effect of Endotoxin. **Advances in Inflammation Research**, 1: 311-316, 1979.

DINCHUK, J.E.; CAR, B.D.; FOCHT, R.J.; JOHNSTON, J.J.; JAFFEE, B.D.; COVINGTON, M.B.; CONTEL, N.R.; ENG, V.M.; COLLINS, R.J.; CZERNIAK, P.M.; *et al.* Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**, 378(6555): 406-409, 1995.

DUBNER R.; BENNETT G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu. Rev. Neurosci.**, 6: 381-418, 1983.

EMBER J.A.; JAGELS, M.A.; HUGLI, T.E. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: Volanakis, J.E.; Frank, M.M. (eds). **The Human Complement System in Health and Disease**. New York: Dekker, 1999. p. 241-284.

FAYYAZI, A.; SANDAU, R.; DUONG, L.Q.; GÖTZE, O.; RADZUN, H.J.; SCHWEYER, S.; SORURI, A.; ZWIRNER, J. C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. **Am. J. Pathol.**, 154(2): 495-501, 1999.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins: Peripheral and central analgesia. In: Bonica, J.J.; Lindblom, U.; Iggor, A. (eds). **Advances in pain research and therapy**. New York: Raven Press, 1983. p. 627-644.

FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; MICHELIN MA, PERRETTI M, FLOWER RJ, POOLE S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.**, 121(5): 883-888, 1997.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, 53(1): 39-48, 1978.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions**, 38 Spec No: C7-9, 1993.

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

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; de CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, 42(3): 365-71, 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**, 334(6184): 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, 18(2): 179-190, 1979.

FLÓREZ, J. Dolor: mecanismos de transmission y control. In: **Terapêutica Farmacológica Del Dolor**. Madrid, 1993. p. 19-39.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. **Bibl. Tuberc.**, 10: 130-148, 1956.

GALLIN, J.L.; SNYDERMAN, R. Overview. In: **Inflammation – Basic Principles and Clinical Correlates**. Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

GARRY, M.G.; HARGREAVES, K.M. Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. **Brain Res.**, 582(1): 139-142, 1992.

GERARD C.; GERARD, N.P. C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. **Ann. Rev. Immunol.**, 12:775, 1994.

GERARD, N.P.; HODGES, M.K.; DRAZEN, J.M.; WELLER, P.F.; GERARD, C. Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. **J. Biol. Chem.**, 264(3): 1760-1766, 1989.

GRIFFIN, R.S.; COSTIGAN, M.; BRENNER, G.J.; MA, C.H.; SCHOLZ, J.; MOSS, A.; ALLCHORNE, A.J.; STAHL, G.L.; WOOLF, C.J. Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. **J. Neurosci.**, 27: 8699-8708, 2007.

GUERRERO, A.T.; VERRI JR, W.A.; CUNHA, T.M.; SILVA, T.A.; ROCHA, F.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 84(2): 244-251, 2006.

GUERRERO, A.T.; VERRI JR, W.A.; CUNHA, T.M.; SILVA, T.A.; SCHIVO, I.R.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. **J. Leukoc. Biol.**, 83(1): 122-130, 2008.

HANDWERKER, H.O. Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors. In: Bonica, J.J. and Albe-Fessard (eds). **Advances in Pain Research and Therapy**. New York: Raven Press, 1976. vol. 1, p. 41-45.

HANESCH, U.; HEPPELMANN, B.; SCHMIDT, R.F. Neurokinin A-like immunoreactivity in articular afferents of the cat. **Brain Res.**, 586(2): 332-335, 1992.

HAWLISCH, H.; WILLS-KARP, M.; KARP, C.L.; KOHL, J. The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. **Mol. Immunol.**, 41, 123-131, 2004.

HARKNESS, R.A. The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte and its biochemistry. **Molec. Aspects Med.**, 4: 191-207, 1981.

HAYNES, D.R.; HARKIN, D.G.; BIGNOLD, L.P.; HUTCHENS, M.J.; TAYLOR, S.M.; FAIRLIE, D.P. Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production in vitro by a new C5a receptor antagonist. **Biochem. Pharmacol.**, 60: 729-733, 2000.

HETLAND, G.; PFEIFER, P.H.; HUGLI, T.E. Processing of C5a by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 63(4): 456-462, 1998.

HINGTGEN, C.M.; WAITE, K.J.; VASKO, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3,5-cyclic monophosphate transduction cascade. **J. Neurosci.** 15(7 Pt 2): 5411-5419, 1995.

INSEL, P.A. Fármacos Analgésicos – Antipiréticos e Antiinflamatórios e Medicamentos usados no Tratamento da Gota. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. (eds). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Santiago, Chile: McGraw-Hill, 1996. p. 450-452.

ISSEKUTZ, T.B.; MIYASAKA, M.; ISSEKUTZ, A.C. Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation. **J. Exp. Med.**, 183(5): 2175-2184, 1996.

JENSEN, K; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, 25(3): 313-323, 1986.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanism of nociception. **Nature**, 413(6852): 203-210, 2001.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Princípios da Neurociência. 4 Ed. Barueri: Manole, 2003. 1430p.

KHASAR, S.G.; McCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J. Neurophysiol.** 81(3): 1104-1112, 1999.

KIENER, H.P.; BAGHESTANIAN, M.; DOMINKUS, M.; WALCHSHOFER, S.; GHANNADAN, M.; WILLHEIM, M.; SILLABER, C.; GRANINGER, W.B.; SMOLEN, J.S.; VALENT, P. Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, 41(2): 233-245, 1998.

KODANI, M.; SAKATA, N.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H.; KATSURAGI, T.; HUGLI, T.E.; ABE, M. Intratracheal administration of anaphylatoxin C5a potentiates antigen-induced pulmonary reactions through the prolonged production of cysteinyl-leukotrienes. **Immunopharmacology**, 49(3): 263-274, 2000.

KUO, D.C.; KAWATANI, M.; DE GROAT, W.C. Vasoactive intestinal polypeptide identified in the thoracic dorsal root ganglia of the cat. **Brain Res.**, 330(1): 178-182, 1985.

LAUDES, I.J.; CHU, J.C.; HUBER-LANG, M.; GUO, R.F.; RIEDEMANN, N.C.; SARMA, J.V.; MAHDI, F.; MURPHY, H.S.; SPEYER, C.; LU, K.T.; LAMBRIS, J.D.; ZETOUNE, F.S.; WARD, P.A. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. **J. Immunol.**, 169: 5962-5970, 2002.

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

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

LEVINE, J.D.; LAM, D.; TAIWO, Y.O.; DONATONI, P.; GOETZL, E.J. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83(14): 5331-5334, 1986.



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

LINTON, S.M.; MORGAN, B.P. Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. *Mol. Immunol.*, 36: 905-914, 1999.

LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur. Cytokine. Netw.**, 13(4): 456-461, 2002.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, 6(7): 521-532, 2005.

MASTELLOS D.; GERMENIS A.E.; LAMBRIS J.D. Complement: an inflammatory pathway fulfilling multiple roles at the interface of innate immunity and development. **Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.**, 4: 125-127, 2005.

MENDONÇA, M.A.; CUNHA, F.Q.; MURTA, E.F.; TAVARES-MURTA, B.M. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 57(5):663-670, 2006.

MELZACK R.; WALL P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, 150(699): 971-979, 1965.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57(1): 1-164, 1999.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J. Neurosci. Methods**, 84(1-2): 41-47, 1998.

MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C.D.; TIANO, H.F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J.C.; MAHLER, J.F.; KLUCKMAN, K.D.; LEDFORD, A.; LEE, C.A.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, 83(3): 473-482, 1995.

MORTON, C.R.; HUTCHINSON, W.D. Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin. **Neurosci.**, 31(3): 807-815, 1989.

NAKAMURA, M; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 135(2): 145-153, 1987.

NAMBAL, T.; OIDA, H.; SUGIMOTO, Y.; KAKIZUKA, A.; NEIGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. **J. Biol. Chem.**, 269(13): 9986-9992, 1994.

O'BARR, S.; COOPER, N.R. The C5a complement activation peptide increases IL-1beta and IL-6 release from amyloid-beta primed human monocytes: implications for Alzheimer's disease. **J. Neuroimmunol.**, 109: 87-94, 2000.

- PERL, E.R. Sensitization of nociceptores and its relation to sensation. In: Bonica, J.J. and Albe-Fessard (eds). **Advances in Pain Research and Therapy**. New York: Raven Press, 1976. vol. 1, p. 17-34.
- POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. **Cytokines and Pain**, 1999. p.59-87.
- PRADO, W.A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: Graeff, F.G. e Guimarães, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu. 1999, p. 175-195.
- RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, 111(4): 409-419, 1957.
- REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.**, 100(2): 297-379, 1954.
- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.**, 60(6): 404-415, 2001.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 115: 1265-1275, 1995.
- SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.**, 331(1): 43-52, 1997.
- SANTOS, D.R.; CALIXTO, J.B.; SOUZA, G.E. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. **Br. J. Pharmacol.**, 139(2): 271-278, 2003.
- SARMA, V.J.; HUBER-LANG, M.; WARD, P.A. Complement in lung disease. **Autoimmunity**, 39(5): 387-394, 2006.
- SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J. Neurophysiol.**, 60(6): 2180-2195, 1988.
- SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; BANCHET, G.S.V. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann. NY Acad. Sci.** 2002, vol. 966, p. 343-354.
- SCHLEIMER, R.P. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, 1: 222-230, 2004.
- SMITH, G.A.; BRETT, C.L.; CHURCH, J. Effects of noradrenaline on intracellular pH in acutely dissociated adult rat hippocampal CA1 neurones. **J. Physiol.**, 512 (Pt 2): 487-505, 1998.
- SOUZA, D.G.; COUTINHO, S.F.; SILVEIRA, M.R.; CARA, D.C.; TEIXEIRA, M.M. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 403(1-2): 121- 128, 2000.

TORRES, M.; FORMAN, H.J. Activation of several MAP kinases upon stimulation of rat alveolar macrophages: role of the NADPH oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, 366: 231-239, 1999.

TWINING, C.M.; SLOANE, E.M.; SCHOENIGER, D.K.; MILLIGAN, E.D.; MARTIN, D.; MARSH, H.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Activation of the spinal cord complement cascade might contribute to mechanical allodynia induced by three animal models of spinal sensitization. **J. Pain**, 6: 174-183, 2005.

VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A.; DA ROCHA, F.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.**, 143: 833-844, 2004.

VAKEVA, A.P.; AGAH, A.; ROLLINS, S.A.; MATIS, L.A.; LI, L.; STAHL, G.L. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. **Circulation**, 97(22): 2259-2267, 1998.

VAN BEEK, J.; ELWARD, K.; GASQUE, P. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. **Ann. NY Acad. Sci.**, 992: 56-71, 2003.

VERRI JR, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Ther.**, 112(1): 116-138, 2006.

VON FREY, M.; UEBER DEN GEBRAUCH; VON REIZHAAREN. Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königlich Saechsischen Gesellschaft der Wissenschaften. In: Druckempfindung und Schmerz. **Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut**. Erste Abhandlung, 1896. v. 23, p. 208-217.

WARD, P.A. The dark side of C5a in sepsis. **Nat. Rev. Immunol.**, 4: 133-142, 2004.

WEISSMANN, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Bull. Hosp. Jt. Dis.**, 64: 12-15, 2006.

WERFEL, T.; OPPERMAN, M.; SCHULZE, M.; KRIEGER, G.; WEBER, M.; GOTZE, O. Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. **Blood**, 79(1): 152-160, 1992.

WONG, D.; PRAMEYA, R.; DOROVINI-ZIS, K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 58(2): 138-152, 1999.

WOODRUFF, T.M.; ARUMUGAM, T.V.; SHIELS, I.A.; REID, R.C.; FAIRLIE, D.P.; TAYLOR, S.M. A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease. **J. Immunol.**, 171: 5514-5520, 2003.

WOODRUFF, T.M.; STRACHAN, A.J.; DRYBURGH, N.; SHIELS, I.A.; REID, R.C.; FAIRLIE, D.P.; TAYLOR, S.M. Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. **Arthritis Rheum.**, 46(9): 2476-2485, 2002.

WOOLF, C.J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; MA, Q.P.; CRILLY, P.; WINTER, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. **Neurosci.**, 62(2): 327-331, 1994.

ZHANG, Y.; BENVENISTE, H.; PIANTADOSI, C.A. Inhibition of nitric oxide synthase increases extracellular cerebral glutamate concentration after global ischemia. **Neurosci. Lett.**, 157(2): 179-182, 1993.

ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; McINTYRE, T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, 13(3): 93-100, 1992.

***ARTIGO PUBLICADO***



## RESEARCH PAPER

# Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain

E Ting<sup>1,3</sup>, ATG Guerrero<sup>1,3</sup>, TM Cunha<sup>1,3</sup>, WA Verri Jr<sup>1,3</sup>, SM Taylor<sup>2</sup>, TM Woodruff<sup>2</sup>, FQ Cunha<sup>1</sup> and SH Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil and <sup>2</sup>School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Australia

**Background and purpose:** C5a, a complement activation product, exhibits a broad spectrum of inflammatory activities particularly neutrophil chemoattraction. Herein, the role of C5a in the genesis of inflammatory hypernociception was investigated in rats and mice using the specific C5a receptor antagonist PMX53 (AcF-[OP(D-Cha)WR]).

**Experimental approach:** Mechanical hypernociception was evaluated with a modification of the Randall–Selitto test in rats and electronic pressure meter paw test in mice. Cytokines were measured by ELISA and neutrophil migration was determined by myeloperoxidase activity.

**Key results:** Local pretreatment of rats with PMX53 (60–180 µg per paw) inhibited zymosan-, carrageenan-, lipopolysaccharide (LPS)- and antigen-induced hypernociception. These effects were associated with C5a receptor blockade since PMX53 also inhibited the hypernociception induced by zymosan-activated serum and C5a but not by the direct-acting hypernociceptive mediators, prostaglandin E<sub>2</sub> and dopamine. Underlying the C5a hypernociceptive mechanisms, PMX53 did not alter the cytokine release induced by inflammatory stimuli. However, PMX53 inhibited cytokine-induced hypernociception. PMX53 also inhibited the recruitment of neutrophils induced by zymosan but not by carrageenan or LPS, indicating an involvement of neutrophils in the hypernociceptive effect of C5a. Furthermore, the C5a-induced hypernociception was reduced in neutrophil-depleted rats. Extending these findings in rats, blocking C5a receptors also reduced zymosan-induced joint hypernociception in mice.

**Conclusions and implications:** These results suggest that C5a is an important inflammatory hypernociceptive mediator, acting by a mechanism independent of hypernociceptive cytokine release, but dependent on the presence of neutrophils. Therefore, we suggest that inhibiting the action of C5a has therapeutic potential in the control of inflammatory pain.

*British Journal of Pharmacology* (2008) 153, 1043–1053; doi:10.1038/sj.bjp.0707640; published online 17 December 2007

**Keywords:** inflammatory pain; hyperalgesia; C5a; complement system; neutrophils; cytokines

**Abbreviations:** BK, bradykinin; CFA, complete Freund's adjuvant; CINC-1, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; IL-1β, interleukin-1β; i.pl., intraplantar; LPS, lipopolysaccharide; MPO, myeloperoxidase; OVA, ovalbumin; PMX53, C5a receptor antagonist; TNF-α, tumour necrosis factor-α; ZAS, zymosan-activated serum

## Introduction

Pain is one the classical symptoms of the inflammatory process. It is now accepted that sensitization of primary nociceptive neurons is the common denominator of inflam-

matory pain that leads to states known as hyperalgesia/allodynia in humans or hypernociception in animal models (Cunha *et al.*, 2007). In experimental studies, this phenomenon has been attributed to the direct action of hypernociceptive inflammatory mediators (mainly prostaglandins and sympathetic amines) on their receptors present in nociceptor membranes, which in the last instance lowers the nociceptor threshold, increasing neuronal membrane excitability (Ferreira *et al.*, 1978b; Khasar *et al.*, 1999; Coutaux *et al.*, 2005). Nevertheless, the release of these

Correspondence: Professor SH Ferreira, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900, University of São Paulo, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil.  
 E-mail: shferrei@mrp.usp.br

<sup>3</sup>These authors have contributed equally to this work.  
 Received 21 August 2007; revised 15 October 2007; accepted 22 November 2007; published online 17 December 2007

nociceptor direct-acting hypernociceptive mediators is generally preceded by a cytokine cascade (Cunha *et al.*, 2005; Verri *et al.*, 2006). Following the administration of inflammatory stimuli in the rat paw, the formation of bradykinin (BK) occurs initially, which triggers subsequent release of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). This key cytokine stimulates two hypernociceptive pathways: interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production, which in turn induces prostanoid production and CXC chemokines (CINC-1/IL-8), which induce the release of sympathetic amines (Ferreira *et al.*, 1988; Cunha *et al.*, 1991, 1992; Lorenzetti *et al.*, 2002). Although these events are critical to the genesis of inflammatory hypernociception, it is important to mention that other inflammatory mediators and cells, such as nerve growth factor (Woolf *et al.*, 1994), leukotriene B<sub>4</sub> (Guerrero *et al.*, 2008) and neutrophils (Levine *et al.*, 1985), also play a crucial role in this inflammatory event.

In the last few decades, the role of the complement system in the genesis of the inflammatory process as well as in inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis, has been gaining increasing attention (Vakeva *et al.*, 1998; Woodruff *et al.*, 2002; Sarma *et al.*, 2006). One of the main effector components of the complement system is the anaphylatoxin C5a. It is one of the most potent inflammatory peptide mediators, and its biological effects result in binding to its G-protein-coupled receptor (C5aR1) present in inflammatory cells, such as neutrophils, eosinophils and monocytes (Chenoweth and Hugli, 1978; Gerard *et al.*, 1989; Werfel *et al.*, 1992). C5a is a potent neutrophil chemoattractant and induces an increase in oxidative burst, phagocytosis and release of granule enzymes by these cells (Hetland *et al.*, 1998).

The role of C5a in the genesis of inflammatory pain is not completely understood. In an early study, Levine *et al.* (1985) demonstrated that the intraplantar (intradermal) administration of C5a produces a mechanical hypernociception that is dependent on the presence of polymorphonuclear leukocytes. The interdependence of neutrophil migration and inflammatory hypernociception has also been demonstrated in other studies (de Abreu Castro and Ferreira, 1979; Lavich *et al.*, 2006). There is also evidence that the activation of the complement system in spinal cord contributes to mechanical hypernociception during different types of neuropathies (Twining *et al.*, 2005). However, to the best of our knowledge, there has been no study investigating the role of C5a in the genesis of hypernociception during innate and adaptive inflammation. In the present study, using a specific C5a receptor antagonist (PMX53; AcF-[OP(D-Cha)WR]), we evaluated the endogenous role of C5a in mechanical inflammatory hypernociception in innate and adaptive immune inflammatory responses and the possible mechanisms by which C5a mediates inflammatory hypernociception. PMX53 belongs to a class of selective small cyclic peptides, which potently and insurmountably inhibit C5a effects on polymorphonuclear leukocytes. For instance, PMX53 inhibits C5a-induced myeloperoxidase (MPO) release from human neutrophils (March *et al.*, 2004). This antagonist is also effective in numerous inflammatory disease models in mice and rats in which the physiopathology depends on complement system activation including rheumatoid

arthritis (Woodruff *et al.*, 2002), inflammatory bowel disease (Woodruff *et al.*, 2003), ischaemia-reperfusion injuries (Woodruff *et al.*, 2004), and recently in a model of neurodegeneration (Woodruff *et al.*, 2006).

## Methods

### Animals

Adult male Wistar rats (weighing 180–200 g) and male C57BL/6 mice (weighing 20–25 g) were used in this study. The animals were housed (five per cage) in temperature-controlled rooms (22–25 °C), with access to water and food *ad libitum*, until used in the Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. All behavioural testing was performed between 0900 and 1700 hours. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain guidelines for the use of animals in pain research and with the approval of the Ethics Committee of the School of Medicine of Ribeirão Preto (University of São Paulo). Each experiment used up to six rats per group. All efforts were made to minimize the number of animals used and any discomfort.

### Mechanical hypernociception test in rat paw

Mechanical hypernociception was tested in rats by using the constant-pressure rat-paw test, as described by Ferreira *et al.* (1978a, b). In this method, a constant pressure of 20 mm Hg (1 mm Hg = 133 Pa) is applied via a syringe piston moved by compressed air to an area of 15 mm<sup>2</sup> on the plantar surface of the hindpaw and discontinued when the rat displays a 'freezing reaction'. The reaction typically comprises a reduction in escape movements (that animals normally make to free themselves), increased vibrissal movements, a variation in the respiratory frequency terminating with a brief apnea concomitant with retraction of the head towards forepaws. The apnea is frequently associated with successive waves of muscular tremor. For each animal, the latency to onset of the freezing reaction is measured before (zero time) and after administration of the hypernociceptive stimuli. In this test, the end point is a behavioural response, the freezing reaction. The constant-pressure rat-paw test over the years has been instrumental in many original observations (Ferreira and Nakamura, 1979a, b; Cunha *et al.*, 1992). The drugs were administered by intraplantar (i.pl.) injection using a 100  $\mu$ l Hamilton microsyringe. The needle was introduced subcutaneously near the third digit, with its tip reaching the middle of the plantar hindpaw. The intensity of hypernociception was measured before the first intraplantar injection by using the values measured at zero hour as control reaction times. The intensity of mechanical hypernociception was quantified as the reduction in the reaction time, calculated by subtracting the value of the subsequent measurements after stimulus injection from the first (zero time) (Ferreira *et al.*, 1978a).

### Dorsal flexion of the tibiotarsal joint: assessment by a modified electronic pressure-meter test for mice

Experiments were performed as described previously (Guerrero *et al.*, 2006). In a quiet room, mice were placed

in acrylic cages (12 × 10 × 17 cm high) with a wire grid floor 15–30 min before testing for environmental adaptation. Stimulations were performed only when animals were quiet, without exploratory movements or defecation and not resting on their paws. In these experiments, an electronic pressure meter was used, which consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA). For this model, a non-standard large tip (4.15 mm<sup>2</sup>) was adapted to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hindpaw to induce the dorsal flexion of the tibiotarsal joint, followed by paw withdrawal. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hindpaw. The electronic pressure-meter apparatus automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was withdrawn. The test was repeated until three successive consistent measurements were obtained (that is, the variation among these measurements was less than 1 g). The flexion-elicited withdrawal threshold is expressed in grams.

#### *Procedures for active immunization in rats*

Ovalbumin (OVA) was dissolved in sterile saline to an appropriate concentration (2 mg ml<sup>-1</sup>) and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA) at a concentration of 1 mg ml<sup>-1</sup> of *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannide mono-oleate. CFA was used to augment the efficiency of the immunization procedure (Freund, 1956) by prolonging the lifetime of injected autoantigen and by stimulating its effective delivery to the immune system. Rats weighing approximately 100 g were injected subcutaneously at two different sites on their back to give a total dose of 200 µg of OVA dissolved in an emulsion containing an equal volume of sterile saline plus CFA. Control (sham-immunized) rats were injected with this emulsion without OVA. After 21 days, the rats were challenged with the intraplantar administration of OVA (25 µg in 100 µl of saline) to the right hindpaw (Cunha *et al.*, 2003).

#### *Preparation of zymosan-activated serum*

Zymosan-activated serum (ZAS), a source of C5a<sub>DesArg</sub> chemotactic factor, was prepared by incubating fresh rat serum with zymosan (10 mg ml<sup>-1</sup>) at 37 °C for 30 min. At the end of the incubation, the zymosan was removed by centrifugation (2 × 10 min at 3000g, room temperature), and the serum was heated to 56 °C for 30 min, aliquoted and kept frozen (-70 °C) until use (Torres and Forman, 1999). The control serum was incubated for 30 min at 37 °C without the addition of zymosan, and the sequence of steps in the procedure was the same as described for ZAS.

#### *Measurement of MPO activity*

The accumulation of neutrophils in the rat paw or in the mouse tibiotarsal joint region was measured by means of tissue MPO activity. After the animals had been killed, subcutaneous tissues of the paws or tibiotarsal bone complex

were removed and assayed for MPO according to a method described previously (Souza *et al.*, 2000). Briefly, tissues were homogenized at 5% (w/v) in EDTA/NaCl buffer (pH 4.7) and centrifuged at 3000g for 15 min, at 4 °C. The pellets were re-suspended in hexadecyltrimethyl ammonium bromide 0.5% buffer (pH 5.4), and the samples were frozen and thawed three times in liquid nitrogen. Upon thawing, the samples were re-centrifuged (3000g, 15 min, at 4 °C) and 2–5 µl of the supernatant was used for the MPO assay. The enzymatic reaction was assessed with 1.6 mM tetramethylbenzidine, 80 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5 mM hydrogen peroxide, and the reaction was terminated with 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was read at 450 nm, and the results are expressed as number of neutrophil × 10<sup>6</sup> per mg tissue.

#### *Determination of TNF-α and IL-1β levels*

The skin of the plantar area of paws was obtained 3 h after saline, zymosan, carrageenan or lipopolysaccharide (LPS) injection and homogenized in 500 µl of the appropriate buffer containing protease inhibitors, and TNF-α and IL-1β levels were determined as described previously (Safieh-Garabedian *et al.*, 1995) by ELISA. Briefly, microtiter plates (Nunc-Maxisorb, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4 °C with sheep anti-rat TNF-α or sheep anti-rat IL-1β. After blocking the plates, rat TNF-α or IL-1β standards at various dilutions in medium and 50 µl of samples were added in triplicate and maintained at room temperature for 2 h. Sheep TNF-α or IL-1β-biotinylated polyclonal antibodies were added at a 1:500 dilution, followed by incubation at room temperature for 1 h. Finally, 100 µl of avidin-horseradish peroxidase (1:5000 dilution) was added to each well and, after 30 min, the plates were washed and the colour reagent OPD (40 µg, 50 µl per well) was added. After 15 min, the reaction was terminated with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M, 50 µl per well) and the absorbance read at 490 nm. The results were obtained by comparing the absorbance with standard curves. In addition, the results were adjusted to 0.5 ml, the volume used to extract the cytokine from the paw skin, and are expressed as picograms of respective cytokine per milliliter. As a control, the levels of these cytokines were determined in animals that received saline (100 µl, i.pl.) or PMX53 (60 µg, 100 µl, i.pl.) 30 min before saline (100 µl, i.pl.) injection.

#### *Experimental protocols*

*Effect of PMX53 on mechanical hypernociception, neutrophil migration and cytokine release induced by zymosan, LPS, carrageenan or OVA.* Rats received saline (100 µl) or PMX53 (60 or 180 µg—zymosan experiments; or 60 µg—LPS, carrageenan or OVA experiments) 30 min before zymosan (30 µg in 100 µl, i.pl.), LPS (0.5 µg in 100 µl, i.pl.), carrageenan (Cg, 100 µg in 100 µl, i.pl.) or OVA (25 µg in 100 µl, i.pl., CFA-immunized animals) stimulus. Mechanical hypernociception was measured 2–24 h and 2–4 days after zymosan injection or 1–24 h after LPS, carrageenan or OVA injection.

We also evaluated the post-treatment effect of PMX53 on zymosan-induced mechanical hypernociception. PMX53 (60 µg in 100 µl, i.pl.) was injected into the right paw on



day 3 after zymosan injection, and hypernociception was measured 1–24 h after the antagonist injection. The groups of animals for MPO and cytokine determination were killed 4 h after zymosan injection or 3 h after LPS, carrageenan or OVA injection, as described above.

In addition, we investigated the effect of PMX53 on zymosan-induced tibiotarsal joint hypernociception. Mice were lightly anaesthetized, and zymosan (30 µg in 5 µl) was administered via a 29 G hypodermic needle inserted into the right tibiotarsal joint region. Control animals received an intra-articular injection of the same volume of sterile saline. PMX53 (0.3, 1 or 3 mg kg<sup>-1</sup>, s.c.) or PMX53 vehicle (saline) was given systemically (subcutaneously) 30 min before zymosan-induced joint hypernociception, and the responses were measured at 1–7 h. Afterwards, mice were killed and the tibiotarsal bone complex was removed and examined for MPO content as described above.

**Effect of PMX53 on mechanical hypernociception and neutrophil migration induced by ZAS or C5a.** Rats received intraplantar injection of ZAS (dilution of 1:300 in 100 µl, i.pl.) or C5a (40 ng in 100 µl, i.pl.) 30 min after PMX53 (60 µg in 100 µl, i.pl.) or saline (100 µl, i.pl.) injection, and the mechanical hypernociceptive responses were performed 1–24 h after ZAS or C5a intraplantar injection. A group of animals was killed, and rat paw tissues were collected 3 h after ZAS injection for MPO determination.

**Effect of PMX53 on mechanical hypernociception induced by BK, TNF-α, CINC-1, IL-1β, PGE<sub>2</sub> and dopamine in rats.** In this set of experiments, PMX53 (60 µg in 100 µl, i.pl.) or saline (100 µl, i.pl.) was injected 30 min before BK (500 ng in 100 µl, i.pl.), TNF-α (2.5 pg in 100 µl, i.pl.), cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) (100 pg in 100 µl, i.pl.), IL-1β (0.5 pg in 100 µl, i.pl.), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (100 ng in 100 µl, i.pl.) or dopamine (3 µg in 100 µl, i.pl.) injection, and the hypernociceptive responses were measured 3 h after stimulus challenge.

Additionally, we investigated the effect of PMX53 on TNF-α-induced tibiotarsal joint hypernociception. Mice were pretreated with PMX53 (3 mg kg<sup>-1</sup>, s.c.) 30 min before TNF-α (100 pg in 5 µl)-induced joint mechanical hypernociception (as described above), and the hypernociceptive responses were measured 1–5 h after TNF-α intra-articular injection.

**Effect of vinblastine sulphate on mechanical hypernociception and neutrophil migration induced by zymosan, C5a or carrageenan.** Animals (rats) received vinblastine sulphate (0.8 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) 72 h before intraplantar injection of saline (100 µl), zymosan (30 µg in 100 µl, i.pl.), C5a (40 ng in 100 µl, i.pl.) or carrageenan (100 µg in 100 µl, i.pl.), and the hypernociceptive responses were measured 3 h after intraplantar injection of stimuli. The animals were killed and the rat plantar tissues were collected for MPO assay.

**Drugs.** The compounds used in this study were PMX53 (Peptech/Promics, Toowong, Queensland, Australia), zymosan, C5a, carrageenan, LPS, CFA, OVA, BK, dopamine, IL-1β,

CINC-1, PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and TNF-α (National Institute for Biological Standards and Control, UK). All compounds were dissolved in sterile saline (Halex-Istar, São Paulo, Brazil) except for PGE<sub>2</sub> (DMSO (dimethylsulphoxide), Sigma-Aldrich, 0.2% in saline).

**Data analysis.** Results are presented as means ± s.e. mean for groups of 3–6 animals. A *t*-test for unpaired groups was used, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's test was used as required. The level of significance was set at *P* < 0.05.

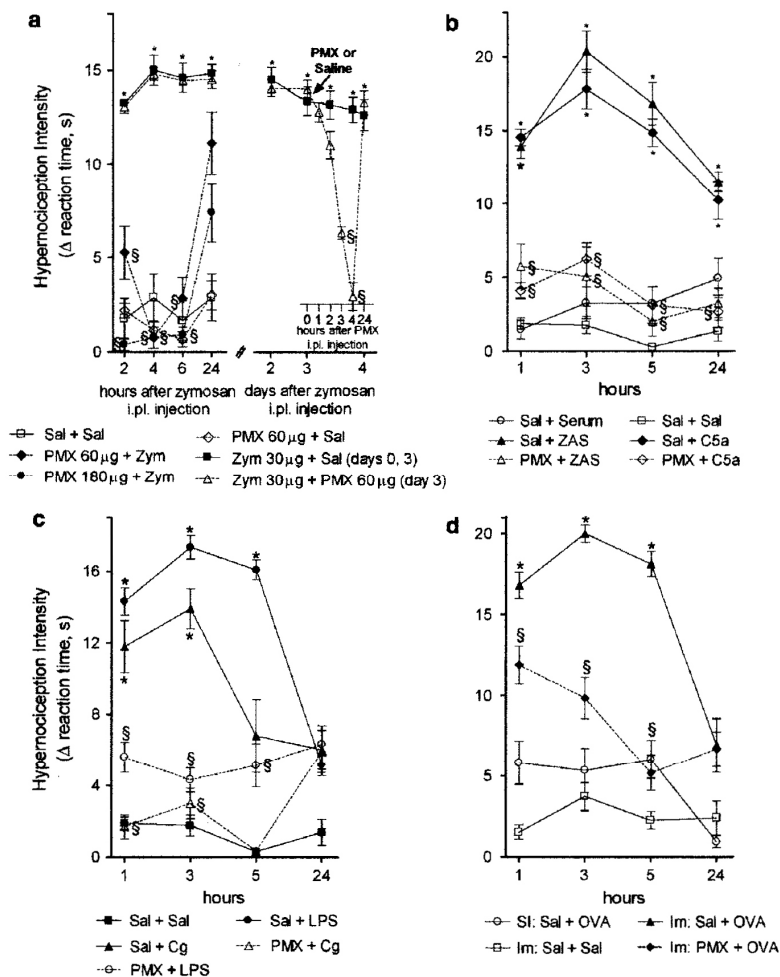
## Results

### *C5a mediates innate and adaptive inflammation-induced mechanical hypernociception*

The importance of C5a in the genesis of inflammatory hypernociception was addressed by treating animals with PMX53, a potent and selective C5a receptor antagonist. The doses of inflammatory stimuli used to induce hypernociception in the rats were as previously determined (Cunha *et al.*, 1991, 1992; Ferreira *et al.*, 1988, 1993). It was observed that local pretreatment of rats (i.pl.) with PMX53 (60 and 180 µg per paw, 30 min before zymosan injection) inhibited zymosan (30 µg per paw)-induced mechanical hypernociception (Figure 1a). The effect of PMX53 was sustained for 6 h after zymosan injection and decreased after 24 h. The local administration of PMX53 (60 µg per paw) did not alter the nociceptive baseline of the animals (Figure 1a).

As a single intraplantar injection of zymosan induces mechanical hypernociception that is maintained for 5 days, we also tested the post-treatment effect of PMX53 in this model. Again, the therapeutic treatment with PMX53 (60 µg per paw, given 3 days after zymosan) significantly reduced the zymosan hypernociception, suggesting that C5a is important in maintaining the ongoing hypernociception induced by zymosan (Figure 1a). Furthermore, the post-treatment of the group (3 days after) that was already pretreated with PMX53 (60 µg per paw) also inhibited the zymosan-induced hypernociception (data not shown).

The incubation of rat serum with zymosan triggers the activation of the complement system with the generation of C5a (Issekutz *et al.*, 1996; Kodani *et al.*, 2000). Thus, to affirm that PMX53 is acting on the C5a receptor, the effect of PMX53 on ZAS- and recombinant C5a-induced hypernociception was tested. Pretreatment of rats with PMX53 inhibited hypernociception induced by either stimulus (Figure 1b). Furthermore, the anti-hypernociceptive effect of PMX53 (60 µg per paw) was also observed on LPS (0.5 µg per paw)- or carrageenan (100 µg per paw)-induced mechanical hypernociception (Figure 1c). These last inflammatory stimuli have been extensively used to investigate the mechanism of innate inflammatory response-induced hypernociception. Besides its role in innate inflammatory response, the complement system also participates in adaptive immune inflammation (Schleimer, 2004). In support of these findings, PMX53 (60 µg per paw) pretreatment also reduced antigen (OVA) challenge-induced hypernociception in previously immunized rats (Figure 1d). Taken together, these results suggest that C5a participates in the



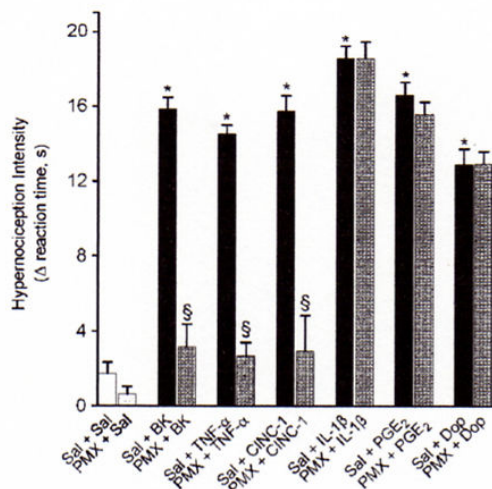
**Figure 1** The C5a receptor antagonist (PMX53) inhibits the mechanical hypernociception induced by different stimuli. (a) PMX53 (PMX, 60 or 180  $\mu$ g, i.p.) was given 30 min before zymosan (Zym, 30  $\mu$ g, i.p.) injection, and the hypernociceptive responses were measured at 2–24 h. PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, i.p.) or saline was also administered on day 3 after zymosan injection, and hypernociception was evaluated 1–24 h after PMX53 treatment. (b) PMX53 (60  $\mu$ g, i.p.) was administered 30 min before zymosan activated serum (ZAS, dilution of 1:300, i.p.) or C5a factor (C5a, 40 ng, i.p.). (c) PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, i.p.) was injected 30 min before lipopolysaccharide (LPS, 0.5  $\mu$ g, i.p.) or carrageenan (Cg, 100  $\mu$ g, i.p.). (d) Ovalbumin (OVA, 25  $\mu$ g, i.p.) was administered to rats previously immunized as described in Methods. (b–d) Hypernociception was evaluated 1–24 h after stimulus injection. The nociceptive baseline of the animals was:  $31.0 \pm 0.26$  s ( $n = 30$ ). \* $P < 0.05$  compared with serum control group for ZAS (Sal + Serum 1:300), (b) or saline paw injected control group (Sal + Sal, a–d);  $^{\S}P < 0.05$  compared with positive control group (Sal + stimulus);  $n = 4–6$  per experiment, representative of two separate experiments.

genesis of hypernociception during the innate and adaptive inflammatory response.

In an attempt to exclude direct blockage of hypernociception by a mechanism other than C5a receptor inhibition, we tested the effect of PMX53 on the hypernociception induced by the nociceptor direct-acting mediators (prostaglandins and sympathetic amines). Indeed, these hypernociceptive mediators act directly in the membrane of nociceptors triggering their sensitization. PMX53 did not alter PGE<sub>2</sub> (100 ng)- or dopamine (3  $\mu$ g)-induced hypernociception (Figure 2), supporting our hypothesis that direct antagonism of the C5a receptor is responsible for the effect of PMX53 on inflammatory hypernociception.

#### C5a does not trigger the hypernociceptive cytokine cascade

It has been demonstrated that inflammatory hypernociception is mediated by a cascade of cytokines initiated by BK in rats (Ferreira *et al.*, 1993). Therefore, it was determined whether the anti-hypernociceptive effect of PMX53 depends on the inhibition of cytokine production. The local pretreatment of rats with PMX53 (60  $\mu$ g per paw) at a dose that inhibits hypernociception did not reduce the release of TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  induced by zymosan (30  $\mu$ g), LPS (0.5  $\mu$ g) or carrageenan (100  $\mu$ g) (Table 1). These results suggest that the inhibition of cytokine production is not the main mechanism involved in the anti-hypernociceptive effect of PMX53.



**Figure 2** PMX53 treatment inhibits hypernociception induced by BK, TNF- $\alpha$  and CINC-1 but not that induced by IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> or dopamine. Rats were pretreated with PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, i.pl.) or saline (Sal, 100  $\mu$ l, i.pl.) 30 min before intraplantar injection of saline (Sal, 100  $\mu$ l), BK (500 ng), TNF- $\alpha$  (2.5 pg), CINC-1 (100 pg), IL-1 $\beta$  (0.5 pg), PGE<sub>2</sub> (100 ng) and dopamine (Dop, 3  $\mu$ g), and hypernociception was evaluated 3 h after stimulus administration. The data are the means  $\pm$  s.e.mean; \* $P$  < 0.05 compared with saline control group (Sal + Sal); <sup>s</sup> $P$  < 0.05 compared with positive control group (Sal + stimulus);  $n$  = 4–5. BK, bradykinin; CINC-1, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; PMX53, C5a receptor antagonist; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ .

#### C5a mediates cytokine-induced hypernociception

Considering that C5a does not mediate the release of cytokines during inflammatory hypernociception, in the next step, we determined whether C5a is involved in the hypernociceptive action of BK and cytokines. To address this question, rats were pretreated with PMX53 (60  $\mu$ g per paw) 30 min before the intraplantar administration of BK (500 ng), TNF- $\alpha$  (2.5 pg), IL-1 $\beta$  (0.5 pg) or CINC-1 (100 pg), and the intensity of hypernociception was determined 3 h thereafter. The doses of these cytokines and BK used were those previously determined to be hypernociceptive (Cunha *et al.*, 1991, 1992; Ferreira *et al.*, 1988, 1993). As shown in Figure 2, pretreatment with PMX53 inhibited the hypernociception induced by BK, TNF- $\alpha$  or CINC-1 but not by IL-1 $\beta$ .

#### Neutrophils participate in C5a-induced inflammatory hypernociception

As demonstrated before, C5a plays a role in neutrophil migration in many inflammatory models. Furthermore, the hypernociceptive effect of C5a depends on neutrophil migration, and neutrophils play a critical role in the genesis of inflammatory hypernociception (Levine *et al.*, 1985). Therefore, we investigated whether C5a mediates inflammatory hypernociception by a neutrophil recruitment-dependent mechanism. To test this hypothesis, rats were treated with PMX53 (60  $\mu$ g per paw) or vehicle (saline) 30 min before

**Table 1** Effect of local administration of PMX53 on the levels of cytokines induced by zymosan, carrageenan or lipopolysaccharide

Treatment	Cytokine (pg per paw)	
	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
Sal + Sal	25 $\pm$ 2	322 $\pm$ 28
PMX + Sal	18 $\pm$ 1	257 $\pm$ 21
Sal + Zym	34 $\pm$ 4*	501 $\pm$ 27*
PMX + Zym	37 $\pm$ 3	480 $\pm$ 19
Sal + Cg	42 $\pm$ 4*	531 $\pm$ 16*
PMX + Cg	42 $\pm$ 2	458 $\pm$ 35
Sal + LPS	63 $\pm$ 4*	608 $\pm$ 8*
PMX + LPS	79 $\pm$ 5	611 $\pm$ 14

Abbreviations: IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; i.pl., intraplantar; PMX, C5a receptor antagonist; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ .

Rats were pretreated with saline (Sal 100  $\mu$ l, i.pl.) or PMX53 (60  $\mu$ g, i.pl.) injection 30 min before zymosan (Zym, 30  $\mu$ g, i.pl.) or carrageenan (Cg, 100  $\mu$ g, i.pl.) or lipopolysaccharide (LPS, 0.5  $\mu$ g, i.pl.) injection. The plantar skin was collected 3 h after intraplantar injection of Zym, Cg or LPS, and the cytokine levels (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) were determined by ELISA. The data are the means  $\pm$  s.e.mean; \* $P$  < 0.05 compared with saline control group (Sal + Sal);  $n$  = 3–4.

the intraplantar administration of carrageenan (100  $\mu$ g per paw), zymosan, ZAS or LPS (Figure 3). At 3 h after inflammatory stimulus injection, the subcutaneous tissues of rat paw were collected for MPO activity assay. This method is used to determine neutrophil content indirectly (Bradley *et al.*, 1982). PMX53 treatment reduced neutrophil migration induced by zymosan, ZAS and C5a (Figure 3). Although neutrophils seem to be important in the genesis of inflammatory hypernociception induced by carrageenan and LPS, we found that PMX53 did not reduce the neutrophil migration induced by these stimuli (Figure 3). It is possible that instead of a role in the recruitment of neutrophils, C5a could be activating neutrophils in LPS- and carrageenan-induced inflammation.

Supporting our hypothesis that neutrophils are important for the genesis of inflammatory hypernociception, depletion of rat neutrophils by vinblastine sulphate treatment (72 h before stimulus challenge) reduced mechanical hypernociception induced by zymosan, C5a or carrageenan (Figure 4a). Moreover, the treatment of rats with vinblastine sulphate abolished neutrophil migration induced by these stimuli (Figure 4b).

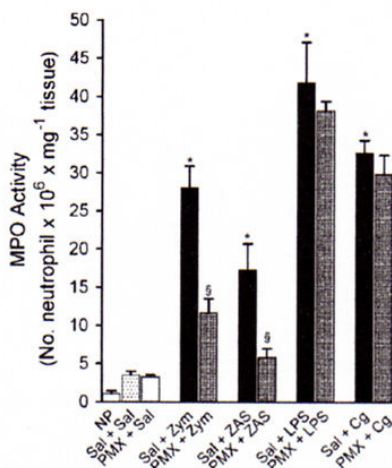
#### C5a participates in the genesis of zymosan-induced articular hypernociception in mice

To extend the concept that C5a is important for inflammatory hypernociception, we tested the effect of PMX53 on the articular hypernociception induced by joint administration of zymosan and TNF- $\alpha$  in mice. It was observed that pretreatment of mice with PMX53 systemically (0.3–3 mg kg<sup>-1</sup>, s.c.) reduced zymosan- and TNF- $\alpha$ -induced articular hypernociception (Figures 5a and c, respectively). PMX53 (3 mg kg<sup>-1</sup>, s.c.) pretreatment also reduced zymosan-induced neutrophil migration to the tibiotarsal joint (Figure 5b).



## Discussion

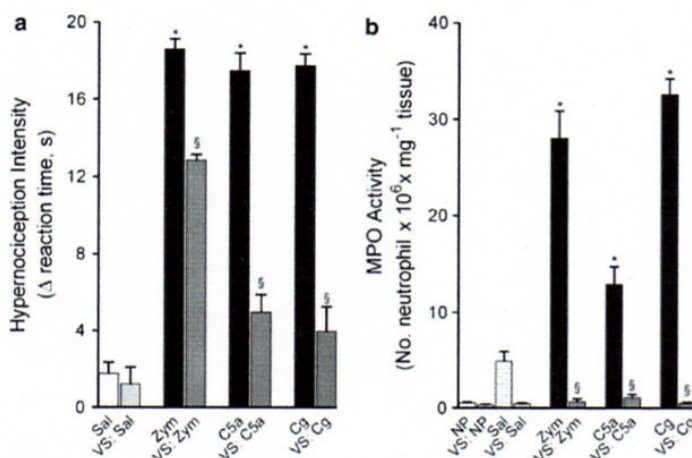
In the present study, we have demonstrated for the first time the involvement of endogenous C5a in the genesis of



**Figure 3** PMX53 inhibits Zymosan- and ZAS-induced neutrophil migration, but not that induced by LPS or Cg. Rats were pretreated with PMX53 (PMX, 60  $\mu$ g, i.pl.) or saline (Sal, 100  $\mu$ l, i.pl.) 30 min before intraplantar injection of saline (Sal, 100  $\mu$ l), zymosan (Zym, 30  $\mu$ g), zymosan-activated serum (ZAS, dilution of 1:300), lipopolysaccharide (LPS, 0.5  $\mu$ g) or carrageenan (Cg, 100  $\mu$ g), and rat plantar skin was collected 4 h after zymosan administration or 3 h after ZAS, LPS or carrageenan administration for assay of myeloperoxidase (MPO) activity (Methods). The naive paw sample (NP) is the control assay. \* $P < 0.05$  compared with saline control group (Sal + Sal); <sup>§</sup> $P < 0.05$  compared with positive control group (Sal + stimulus);  $n = 4$ .

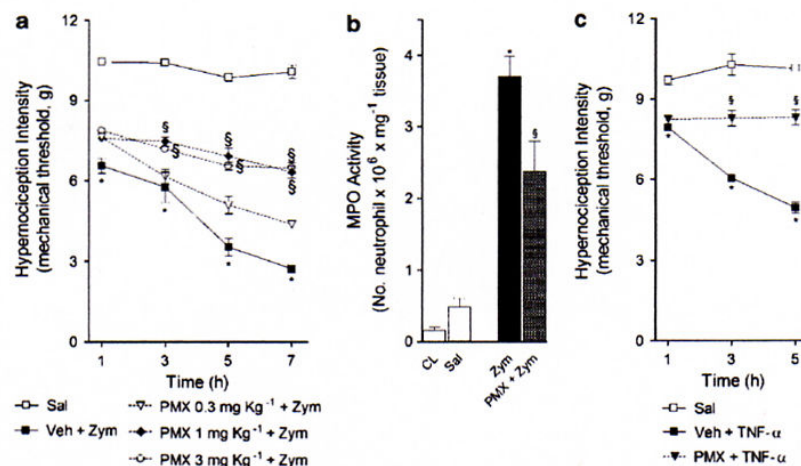
mechanical hypernociception during the innate and adaptive inflammatory response. Furthermore, PMX53, a selective C5a receptor antagonist, displayed a potent peripheral anti-hypernociceptive effect in different inflammatory models, both in rats and mice. The hypernociceptive activity of C5a was not associated with triggering the hypernociceptive cytokine cascade. However, C5a is involved in the hypernociceptive effect of these cytokines and, moreover, our results demonstrated that neutrophils are involved in the hypernociceptive effect of C5a.

The involvement of the complement system in many inflammatory conditions has been demonstrated extensively (Linton and Morgan, 1999; Arumugam *et al.*, 2004; Hawlisch *et al.*, 2004; Ward, 2004). Initially, the constituents of the complement system were considered mediators mainly of the innate immune response by their ability to enhance phagocytosis and consequently the host defence against pathogens (van Beek *et al.*, 2003). Later, the participation of the complement system in the physiopathology of a variety of acute and chronic inflammatory diseases was also demonstrated. For instance, the complement system, especially through C5a, plays a crucial role in the recruitment and activation of neutrophils and other leukocytes in different models of inflammation and diseases such as rheumatoid arthritis (Woodruff *et al.*, 2002; Weissmann, 2006). However, the hypernociceptive role of C5a has not been fully elucidated. In one of the first studies that investigated the hypernociceptive activity of C5a, it was demonstrated that C5a injected intraplantarly in rat induces mechanical hypernociception (Levine *et al.*, 1985). In the present study, by using the C5a receptor antagonist PMX53, we have shown that C5a acting on its receptor mediates mechanical hypernociception induced by zymosan, carrageenan, LPS or antigen (OVA). We also tested the effect of this drug on the hypernociceptive effect of the nociceptor



**Figure 4** Vinblastine sulphate-induced neutrophil depletion reduces mechanical hypernociception. Rats were pretreated with vinblastine sulphate (VS, 0.8 mg kg<sup>-1</sup>) or saline (Sal, 200  $\mu$ l) intravenously 72 h before the injection of saline (100  $\mu$ l i.pl.), zymosan (Zym, 30  $\mu$ g i.pl.), C5a factor (C5a, 40 ng, i.pl.) or carrageenan (Cg, 100  $\mu$ g, i.pl.). (a) Mechanical hypernociception was evaluated 3 h after stimulus injection. (b) Rat plantar skin was collected 3 h after stimulus administration for MPO activity determination. The naive paw sample (NP) is the control assay for MPO activity. \* $P < 0.05$  compared with saline control group (Sal + Sal); <sup>§</sup> $P < 0.05$  compared with positive control group (Sal + stimulus);  $n = 4-5$ . MPO, myeloperoxidase; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ .





**Figure 5** PMX53 inhibits flexion-elicited hypernociception in mouse tibiotarsal joints. (a) PMX53 (PMX, 0.3–3 mg kg<sup>-1</sup>) or vehicle (saline) was injected subcutaneously (systemically) 30 min before intra-articular injection of zymosan (Zym, 30 µg in 5 µl), and the hypernociceptive response was measured 1–7 h after zymosan administration. (b) The tibiotarsal joint was collected at 7 h after intra-articular injection of zymosan (Zym, 30 µg in 5 µl) or saline for MPO activity determination. The contralateral joint (CL) is the control assay for MPO activity. (c) PMX53 (PMX, 3 mg kg<sup>-1</sup>, s.c.) or vehicle (saline) was administered 30 min before intra-articular injection of TNF-α (100 pg in 5 µl), and hypernociceptive response measured 1–5 h after TNF-α injection. \**P* < 0.05 compared with saline control group (Sal); †*P* < 0.05 compared with positive control group (Zym or TNF-α); *n* = 5. MPO, myeloperoxidase; TNF-α, tumour necrosis factor-α.

direct-acting hypernociceptive mediators (PGE<sub>2</sub> and dopamine), which act directly on their receptors present on the membrane of primary nociceptive fibres (Cunha *et al.*, 1991; Lorenzetti *et al.*, 2002). As expected, PMX53 inhibited the mechanical hypernociception induced by ZAS and recombinant C5a, but not that induced by the direct-acting mediators. These results confirm that the antihypernociceptive effect of PMX53 is primarily due to inhibition of C5a receptors. An important finding was that therapeutic (that is post-challenge) treatment with PMX53 also inhibits zymosan-induced sustained hypernociception, suggesting that endogenous C5a release is involved in the maintenance of long-lasting hypernociception induced by zymosan. Thus, it raises the possibility of therapeutic use of C5a receptor antagonists to control chronic inflammatory pain. In support of this notion, oral treatment with PMX53 administered following the onset of experimental arthritis ameliorates disease pathology in rats (Woodruff *et al.*, 2002). In this last study, animals that received PMX53 had significant reductions in right knee swelling, gait disturbance, migrated joint cell numbers and right knee histopathology, as well as intra-articular levels of IL-6 and TNF-α and serum levels of TNF-α. Although inflammatory pain is one of the most important symptoms of rheumatoid arthritis, the antinociceptive effect of PMX53 was not addressed in that particular study. In the present study, extending the therapeutic potential of PMX53, we have demonstrated that PMX53 treatment inhibited, in a dose-dependent manner, hypernociception during zymosan- and TNF-α-induced monoarthritis, as well as joint neutrophil migration in mice. In agreement with our findings, it has recently been shown that systemic treatment of rats with PMX53 reduced the hypernociception in an experimental model of pain after surgery, incisional pain (Clark *et al.*, 2006).

In previous studies, we demonstrated that inflammatory hypernociception is mediated by a cascade of cytokines triggered by BK (BK triggers TNF-α → IL-6 → IL-1β → PGE<sub>2</sub>; and TNF-α → CINC-1 → sympathetic amines) (Cunha *et al.*, 1991, 1992; Ferreira *et al.*, 1993; Verri *et al.*, 2006). Taking into account that C5a induces the release of several pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and chemokines (O'Barr and Cooper, 2000; Laudes *et al.*, 2002) and that PMX53 inhibits cytokine production in an experimental model of nociception after incisional surgery (Clark *et al.*, 2006), as well as in experimental rheumatoid arthritis (Woodruff *et al.*, 2002), we investigated whether the effect of PMX53 depends on the inhibition of cytokine production, using our models of inflammatory hypernociception. At a dose that significantly inhibits hypernociception, PMX53 did not affect TNF-α and IL-1β production induced by LPS, carrageenan and zymosan. Thus, it seems that the inhibition of cytokine production is not responsible for the marked antihypernociceptive effect of PMX53. It is important to note that there is also evidence in the literature that C5a does not directly induce the production of pro-inflammatory cytokines (Haynes *et al.*, 2000). In fact, C5a alone failed to induce the release of IL-1β, TNF-α and IL-6 from human monocytes (Haynes *et al.*, 2000). The differences between models could explain these contradictory data.

The inability of C5a to trigger the hypernociceptive cytokine cascade led us to test whether it could mediate the hypernociceptive action of these cytokines. It was observed that PMX53 reduces BK-(which acts through release of cytokines, see above), TNF-α and CINC-1-induced mechanical hypernociception. However, it was not able to inhibit IL-1β-induced hypernociception. This suggests that the role of C5a in inflammatory hypernociception fits in a downstream position of the described cytokine cascade. The

inability of PMX53 to inhibit IL-1 $\beta$  hypernociception is expected, as this cytokine induces hypernociception via the direct production of prostanoids by COX (Ferreira *et al.*, 1988, 1997).

Our group and others showed that neutrophil migration to inflammatory sites and/or their activation play a crucial role on the genesis of inflammatory hypernociception (de Abreu Castro and Ferreira, 1979; Levine *et al.*, 1985; Lavich *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, unpublished observation). Recently we demonstrated that neutrophils, instead of being responsible for initiating the cytokine cascade, are critical for cytokine-induced hypernociception (Cunha *et al.*, unpublished observation). Thus, we investigated whether C5a contributes to inflammatory hypernociception through a neutrophil-dependent mechanism. In agreement with a previous study (Levine *et al.*, 1985), it was observed that the hypernociceptive action of C5a is associated with the presence of neutrophils, as its hypernociceptive effect was reduced (93% compared with control group) by neutrophil depletion in vinblastine-treated rats. Vinblastine treatment also reduced the hypernociception induced by carrageenan and zymosan, confirming the participation of neutrophils in the onset of hypernociception. Taking into account this information and that in inflammatory disease models, such as rheumatoid arthritis and ischaemia/reperfusion, the effectiveness of PMX53 is closely related to the inhibition of neutrophil migration or activation (Woodruff *et al.*, 2003). Therefore, we examined whether the antinociceptive effect of PMX53 is a consequence of the inhibition of neutrophil accumulation. It was seen that PMX53 reduced neutrophil migration induced by zymosan, ZAS or C5a, but not that induced by carrageenan or LPS. Firstly, these results confirm that the main mediator present in ZAS and generated *in vivo* after zymosan administration that mediates neutrophil migration is C5a, whereas other chemotactic mediators could participate in carrageenan- and LPS-induced neutrophil recruitment. For instance, there is evidence that TNF- $\alpha$ , leukotriene B<sub>4</sub> and chemokines mediate neutrophil migration induced by these inflammatory stimuli (da Rocha *et al.*, 2004; Vale *et al.*, 2004). Secondly, the results also suggest that the anti-nociceptive effect of PMX53 is not mainly due to the inhibition of the migration process. Thus, although the recruitment of neutrophils is essential for the genesis of inflammatory hypernociception, in the absence of their activation by C5a, hypernociception is not triggered even though they are present in the inflammatory focus. It is possible that C5a generated in the inflammatory focus activates the recruited neutrophils to produce permissive hypernociceptive products yet to be determined (Hetland *et al.*, 1998; Castellheim *et al.*, 2005). For instance, there is evidence that the activation of neutrophils leads to the production of prostaglandins and of 15-HETE, which also shows a hypernociceptive effect (Levine *et al.*, 1985; Akama *et al.*, 1990; Cunha *et al.*, unpublished observations). Furthermore, the activation of C5a receptors on neutrophils promotes oxidative burst with free radical production and the release of enzyme granules, which could also be involved in inflammatory hypernociception (Bazargani, 2005). Although the neutrophil seems to be the main inflammatory cell involved in the hypernociceptive action of C5a, as

mentioned before, its receptors are also expressed in other immune cells such as macrophages and mast cells (Kiener *et al.*, 1998; Fayyazi *et al.*, 1999), which have also been observed to be involved in a variety of chronic pain models (Marchand *et al.*, 2005). Therefore, further studies are needed to investigate whether these cells also contribute directly or indirectly to the pro-nociceptive activity of C5a.

Besides the peripheral role of C5a described above, we could not discard the possibility that C5a could also participate in the genesis of inflammatory hypernociception by an effect on the central nervous system. In this context, in a recent study, Griffin *et al.* (2007) showed that during different models of neuropathic pain, there is an increase in the production of complement system components by microglial cells at the spinal cord. Further supporting the role of the complement system for the genesis of neuropathic pain, more specifically of C5a, it was demonstrated that disrupted C5 signalling using C5-deficient mice, as well as by intrathecal treatment with a C5aR1 antagonist, ameliorates nerve injury-induced allodynia (Griffin *et al.*, 2007). Furthermore, intrathecal administration of C5a induces cold allodynia in a dose-dependent manner (Griffin *et al.*, 2007).

In summary, the present study demonstrates the importance of endogenous C5a in the genesis of mechanical hypernociception in several inflammatory models and in two different animal species. The role of C5a in inflammatory hypernociception does not involve the triggering of hypernociceptive cytokine production, but seems to be dependent on the presence of neutrophils at the inflammatory site. In conclusion, these results point to the blockade of the C5a receptor as a promising pharmacological approach to control inflammatory pain of different origins. Certainly, PMX53 merits further studies on its possible therapeutic use for the control of pain.

## Acknowledgements

We thank Ieda Regina dos Santos Schivo, Sérgio Roberto Rosa and Giuliana Bertozi Francisco for excellent technical support. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We are very grateful to Promics/Peptech Ltd for supplying us with PMX53 for these studies.

## Conflict of interest

SMT was the Scientific Director, CSO (2001–2006), and a founder of Promics Ltd. TMW was a Scientific Consultant to Promics/Peptech 2003–2007.

## References

- Akama H, Ichikawa Y, Matsushita Y, Shinozawa T, Homma M (1990). Mononuclear cells enhance prostaglandin E<sub>2</sub> production of

- polymorphonuclear leukocytes via tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 857–862.
- Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM (2004). The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 21: 401–409.
- Bazargani F (2005). Acute inflammation in peritoneal dialysis: experimental studies in rats. Characterization of regulatory mechanisms. *Swed Dent J Suppl* 1–57: i.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206–209.
- Castellheim A, Pharo A, Fung M, Saugstad OD, Mollnes TE (2005). Complement C5a is a key mediator of meconium-induced neutrophil activation. *Pediatr Res* 57: 242–247.
- Chenoweth DE, Hugli TE (1978). Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3943–3947.
- Clark JD, Qiao Y, Li X, Shi X, Angst MS, Yeomans DC (2006). Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression. *Anesthesiology* 104: 1274–1282.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 72: 359–371.
- Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH (1991). Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 104: 765–767.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 107: 660–664.
- Cunha JM, Sachs D, Canetti CA, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ (2003). The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. *Br J Pharmacol* 139: 1135–1145.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Poole S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH (2007). Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. In: DeLeo J, Sorkin L, Watkins L (eds). *Immune and Glial Regulation of Pain*. IASP Press: Seattle.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1755–1760.
- da Rocha FA, Teixeira MM, Rocha JC, Giraó VC, Bezerra MM, Ribeiro Rde A et al. (2004). Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 497: 81–86.
- de Abreu Castro MS, Ferreira SH (1979). Cell migration and hyperalgesia: a paradoxical effect of endotoxin. *Adv Inflamm Res* 1: 311–316.
- Fayyazi A, Sandau R, Duong LQ, Gotze O, Radzun HJ, Schweyer S et al. (1999). C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 154: 495–501.
- Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ et al. (1997). Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol* 121: 883–888.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S (1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 334: 698–700.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM (1978a). Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53: 39–48.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 110: 1227–1231.
- Ferreira SH, Nakamura M (1979a). II—Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins* 18: 191–200.
- Ferreira SH, Nakamura M (1979b). III—Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. *Prostaglandins* 18: 201–208.
- Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS (1978b). The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 16: 31–37.
- Freund J (1956). The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc* 10: 130–148.
- Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF, Gerard C (1989). Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem* 264: 1760–1766.
- Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, Ma CH, Scholz J, Moss A et al. (2007). Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *J Neurosci* 27: 8699–8708.
- Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH et al. (2006). Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 244–251.
- Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Schivo IR, Dal-Secco D et al. (2008). Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. *J Leukoc Biol* 83: 9.
- Hawlich H, Wills-Karp M, Karp CL, Kohl J (2004). The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma. *Mol Immunol* 41: 123–131.
- Haynes DR, Harkin DG, Bignold LP, Hutchens MJ, Taylor SM, Fairlie DP (2000). Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production *in vitro* by a new C5a receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 60: 729–733.
- Hetland G, Pfeifer PH, Hugli TE (1998). Processing of C5a by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 63: 456–462.
- Issekutz TB, Miyasaka M, Issekutz AC (1996). Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation. *J Exp Med* 183: 2175–2184.
- Khasar SG, McCarter G, Levine JD (1999). Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and *in vitro* sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol* 81: 1104–1112.
- Kiener HP, Baghestanian M, Dominkus M, Walchshofer S, Ghannadan M, Willheim M et al. (1998). Expression of the C5a receptor (CD88) on synovial mast cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: 233–245.
- Kodani M, Sakata N, Takano Y, Kamiya H, Katsuragi T, Hugli TE et al. (2000). Intratracheal administration of anaphylatoxin C5a potentiates antigen-induced pulmonary reactions through the prolonged production of cysteinyl-leukotrienes. *Immunopharmacology* 49: 263–274.
- Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, Sarma JV et al. (2002). Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* 169: 5962–5970.
- Lavich TR, Siqueira Rde A, Farias-Filho FA, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, Martins MA (2006). Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. *Pain* 125: 180–187.
- Levine JD, Gooding J, Donatoni P, Borden L, Goetzl EJ (1985). The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. *J Neurosci* 5: 3025–3029.
- Linton SM, Morgan BP (1999). Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. *Mol Immunol* 36: 905–914.
- Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2002). Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw* 13: 456–461.
- March DR, Proctor LM, Stoermer MJ, Sbaglia R, Abbenante G, Reid RC et al. (2004). Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Relationships between structures and activity. *Mol Pharmacol* 65: 868–879.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6: 521–532.
- O'Barr S, Cooper NR (2000). The C5a complement activation peptide increases IL-1beta and IL-6 release from amyloid-beta primed human monocytes: implications for Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 109: 87–94.
- Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ (1995). Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 115: 1265–1275.
- Sarma VJ, Huber-Lang M, Ward PA (2006). Complement in lung disease. *Autoimmunity* 39: 387–394.
- Schleimer RP (2004). Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 1: 222–230.
- Souza DG, Coutinho SF, Silveira MR, Cara DC, Teixeira MM (2000). Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote



- reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *Eur J Pharmacol* 403: 121–128.
- Torres M, Forman HJ (1999). Activation of several MAP kinases upon stimulation of rat alveolar macrophages: role of the NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 366: 231–239.
- Twining CM, Sloane EM, Schoeniger DK, Milligan ED, Martin D, Marsh H *et al.* (2005). Activation of the spinal cord complement cascade might contribute to mechanical allodynia induced by three animal models of spinal sensitization. *J Pain* 6: 174–183.
- Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL (1998). Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 97: 2259–2267.
- Vale ML, Benevides VM, Sachs D, Brito GA, da Rocha FA, Poole S *et al.* (2004). Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 143: 833–844.
- van Beek J, Elward K, Gasque P (2003). Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992: 56–71.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112: 116–138.
- Ward PA (2004). The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4: 133–142.
- Weissmann G (2006). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull Hosp Jt Dis* 64: 12–15.
- Werfel T, Oppermann M, Schulze M, Krieger G, Weber M, Gotze O (1992). Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood* 79: 152–160.
- Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM (2003). A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 171: 5514–5520.
- Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM (2004). Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia–reperfusion in rats. *J Surg Res* 116: 81–90.
- Woodruff TM, Crane JW, Proctor LM, Buller KM, Shek AB, de Vos K *et al.* (2006). Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. *FASEB J* 20: 1407–1417.
- Woodruff TM, Strachan AJ, Dryburgh N, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP *et al.* (2002). Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 46: 2476–2485.
- Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J (1994). Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 62: 327–331.



***ANEXO***

## CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 145/2006, sobre o projeto intitulado “*Efeito anti-hipernociceptivo de antagonistas C5a na hipernocicepção mecânica induzida por variados estímulos em pata de rato*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **18 de dezembro de 2006**.

(We certify that the protocol n° 145/2006, about “*Anti-hypernociceptive effect of C5a antagonist receptor on mechanical hypernociception induced by inflammatory stimuli in the rat paw*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 12/18/2006 meeting).

Ribeirão Preto, 19 de dezembro de 2006.

  
**Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES**  
Presidente da Comissão de Ética  
em Experimentação Animal

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)