

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FILIPPE CÉSAR DO PRADO

**“PAPEL DO RECEPTOR P2X3 E DA ATIVAÇÃO DA
PROTEÍNA KINASE C ÉPSILON DOS NEURÔNIOS
NOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS NA DOR INFLAMATÓRIA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FILIPPE CÉSAR DO PRADO
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P882p	<i>Prado, Filipe César do</i> Papel do receptor P2X3 e da ativação da proteína quinase C épsilon dos neurônios nociceptivos periféricos na dor inflamatória / Filipe César do Prado. – Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Carlos Amílcar Parada. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Receptor P2X3. 2. Dor inflamatória. 3. Proteína quinase c-épsilon. I. Parada, Carlos Amílcar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	---

Título em inglês: Role of P2X3 receptor and PKC epsilon activation of peripheral nociceptive neurons on inflammatory pain.

Palavras-chave em inglês: P2X3 receptor; Inflammatory pain; Protein kinase c-epsilon.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Carlos Amílcar Parada, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Cristiane Flora Villarreal.

Data da defesa: 24/06/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 24 de Junho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira


Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Assinatura

Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Assinatura

fatima Alonso

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Papel do receptor P2X3 e da ativação da proteína quinase épsilon dos neurônios nociceptivos na dor inflamatória"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp, sob Protocolo(s) nº1588-1.

* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Filipe César do Prado
Aluno: Filipe César do Prado

C. Amílcar Parada
Orientador: Carlos Amílcar Parada

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Apinecia Gualdo

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APINECIA GUALDO
Presidente da CEEA/UNICAMP

ÍNDICE

1. Resumo	6
2. Abstract	8
3. Introdução	10
4. Artigo	21
4.1. Abstract	22
4.2. Introduction	24
4.3. Methods	26
4.4. Results	31
4.5. Discussion	38
4.6. References	42
5. Discussão	45
6. Referências bibliográficas	49

Resumo

Enquanto a hiperalgesia inflamatória depende da liberação de prostaglandinas e/ou de aminas simpatomiméticas que sensibilizam os neurônios aferentes primários, nosso grupo demonstrou recentemente que o bloqueio do receptor P2X3 no tecido periférico previne a hiperalgesia induzida pela carragenina.. No entanto, o mecanismo pelo qual a ativação dos receptores P2X3 neuronais contribui para a hiperalgesia inflamatória não está completamente estabelecido. O presente estudo verifica se a ativação do receptor P2X3 dos neurônios aferentes primários contribui para a hiperalgesia mecânica induzida pela prostaglandina E₂ ou pela dopamine no tecido periférico. A co-administração de A317491 (60 µg / paw), um antagonista seletivo do receptor P2X3, ou o pré-tratamento com dexametasona (1 mg / mL / kg), preveniu a hiperalgesia mecânica medida 3 horas depois da administração de carragenina (300 µg / paw) na pata posterior de ratos. A administração de $\alpha\beta$ meATP (50 µg /paw) induziu hiperalgesia mecânica 1 hora, mas não 3 horas, depois da sua administração, que foi prevenida pela dexametasona ou pelo A317491. Doses sublimiáres de PGE₂ (4 ng / paw) ou dopamina (0.4 µg / paw) que não induzem hiperalgesia por si só, induziram hiperalgesia, 3 horas depois, quando administradas logo depois de $\alpha\beta$ meATP ou carragenina em ratos tratados com dexametasona. Esses estados de hiperalgesia (“priming”) revelados pelas doses sublimiáres de PGE₂ ou dopamine foram prevenidos pelo A317491 ou pelo tratamento com administração intraganglionar (DRG-L5) de ODN antisense, mas não pelo ODN mismatch, contra o receptor P2X3 (40 µg /5µL once a day for 4 days). ODN antisense, mas não o ODN mismatch, reduziu a expressão dos receptores P2X3 no nervo safeno e no

DRG-L5. Para verificar se a PKC ϵ media esse estado de hiperalgesia, inibidor de translocação de PKC ϵ (1 μ g/paw) foi administrado no tecido periférico 45 minutos antes do α β meATP ou PGE $_2$ (100 ng/paw). O inibidor de PKC ϵ preveniu o estado de hiperalgesia induzido pelo α β meATP (“priming”), mas não a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE $_2$ (100 ng/paw).

Dessa maneira, os resultados desse estudo sugerem que a hiperalgesia inflamatória dependeu da ativação dos receptores P2X $_3$ neuronais e da subsequente translocação da PKC ϵ , que aumenta a susceptibilidade dos neurônios aferentes primários (priming) à ação de outros mediadores inflamatórios como a PGE $_2$ e as aminas simpatomiméticas.

Abstract

While inflammatory hyperalgesia depends on the release of prostaglandins and/or sympathetic amines that ultimately sensitize the primary afferent neurons, we have recently demonstrated that blockade of P2X3 receptor in the peripheral tissue completely prevents carrageenan-induced hyperalgesia. However, the mechanism by which the activation of neuronal P2X3 receptor contributes to the inflammatory hyperalgesia is not completely clear. The present study verifies whether the activation of P2X3 receptor on primary afferent neurons contributes to the mechanical hyperalgesia induced by prostaglandin E₂ or dopamine in the peripheral tissue. Co-administration of A317491 (60 µg / paw), a selective P2X_{3,2/3} receptor antagonist, or pre-treatment with dexamethasone (1 mg / mL / Kg), prevented the mechanical hyperalgesia measured 3 hours after the administration of carrageenan (300 µg / paw) in the rat's hind paw. The administration of αβmeATP (50 µg / paw) induced mechanical hyperalgesia 1 hour, but not 3 hours, after its administration, which also was prevented by dexamethasone or A317491. Sub-threshold doses of PGE₂ (4 ng / paw) or dopamine (0.4 µg / paw) that do not induce hyperalgesia by themselves, induced maximal hyperalgesia, 3 hours after, when administered just following αβmeATP or carrageenan in rats treated with dexamethasone. These hyperalgesic states ("priming") revealed by sub-threshold doses of PGE₂ or dopamine were prevented by A317491 or treatment with ganglionar administrations (DRG-L5) of ODN antisense, but not ODN mismatch, against P2X3 receptor (40 µg / 5µL once a day for 4 days). ODN antisense, but not ODN mismatch reduced the expression of P2X3 receptors in the saphenous nerve and in DRG-L5. To verify

whether PKC $_{\epsilon}$ mediates this hyperalgesic state, PKC $_{\epsilon}$ translocation inhibitor (1 μ g/paw) was administrated in peripheral tissue 45 min. before $\alpha\beta$ meATP or PGE $_2$ (100 ng/paw). PKC $_{\epsilon}$ inhibitor inhibited the hyperalgesic state induced by $\alpha\beta$ meATP (“priming”), but not the mechanical hyperalgesia induced by PGE $_2$ (100 ng/paw).

Briefly, the findings of this study suggest that the inflammatory hyperalgesia depends on neuronal activation of P2X3 receptor and the subsequent PKC $_{\epsilon}$ translocation, which increases the susceptibility of primary afferent neurons (priming) to others inflammatory mediators such as PGE $_2$ and symphatetic amines

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nocicepção

Durante o processo evolutivo, a sensação dolorosa, no seu mais amplo aspecto, ou seja, relativo a um comportamento aversivo e desagradável, foi um dos principais determinantes à sobrevivência das espécies.

Apesar de freqüentemente utilizada, a palavra dor não tem uma definição ideal. A dificuldade para defini-la está no fato de que a dor, além dos aspectos anatômicos e neurofisiológicos, apresenta um componente psíquico de caráter emocional. A “International Association for Study of Pain” (IASP) define dor, do ponto de vista fisiológico, como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que se relaciona a uma lesão real ou potencial dos tecidos”. Neste sentido, a dor tem um importante papel de proteção aos tecidos orgânicos.

Tecnicamente, dor é a “percepção desagradável de uma sensação nociceptiva”, sendo que o componente que resulta na percepção envolve aspectos culturais e psíquico-emocionais com tonalidade afetiva desagradável, aversiva ou oposta ao prazer e o componente resultante na sensação está relacionado à estimulação da via sensorial nociceptiva.

As vias de condução da informação nociceptiva são compostas por conjuntos de neurônios periféricos (fibras aferentes primárias) e por conjuntos de neurônios medulares (neurônios de segunda ordem) (Aguggia, 2003). As fibras aferentes primárias são neurônios pseudo-unipolares, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal e emitem ramificações para periferia e para o corno dorsal da medula espinal (Aguggia, 2003). Os

nociceptores, por possuírem alto limiar de ativação e terminações nervosas livres, ou seja, não-associadas a receptores sensoriais especializados, estão diretamente relacionadas a estímulos intensos variados. Existem dois tipos de fibras que conduzem estímulos nociceptivos: fibras A-delta ($A\delta$), de médio diâmetro, finamente mielinizadas, com velocidade de condução média, entre 12 e 30 m/s (correspondentes a 20% das fibras de dor e responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante que é sentida após estimulação nociva), e fibras C não-mielinizadas, de pequeno diâmetro, com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) (correspondentes a 80% das fibras condutoras da dor e responsáveis pela dor lenta e difusa) (Julius & Basbaum, 2001). Considerando-se o critério funcional, observou-se que as fibras $A\delta$ respondem mais comumente a estimulações mecânicas e térmicas, enquanto as fibras do tipo C respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo por este motivo, denominadas de nociceptores polimodais.

A nocicepção é basicamente um fenômeno iônico, através do qual um estímulo capaz de ativar os nociceptores é detectado e conduzido por neurônios da via nociceptiva. Quando um estímulo é capaz de alcançar o limiar de disparo dos potenciais de ação das fibras aferentes primárias, um impulso elétrico é gerado e conduzido por estas fibras até os centros superiores onde serão processados e percebidos como dor (Aguggia, 2003). Esse estímulo pode ser de naturezas mecânica, térmica ou química e ter origem interna ou externa ao organismo (Aguggia, 2003). A ativação dos nociceptores é capaz de deflagrar um potencial de ação que é transmitido ao longo das fibras aferentes primárias até a medula espinal. Neste ponto, ocorrem sinapses com o neurônio de segunda

ordem, que enviam projeções ascendentes conduzindo a informação nociceptiva a sítios intermediários ou diretamente ao tálamo. Uma via específica de condução se projeta do tálamo para áreas sensitivas do córtex. Outra via, também projetada do tálamo, ramifica-se no sistema límbico, onde os aspectos emocionais e afetivos serão integrados na experiência da percepção da dor (Aguggia, 2003).

Pode-se resumir, então, que a nocicepção ocorre em dois passos: a transdução do estímulo nas terminações periféricas e a transmissão destes sinais ao sistema nervoso central.

1.2. Hiperalgisia

A hiperalgisia (Cunha et al., 2005), é resultante de situações nas quais ocorre diminuição do limiar de ativação dos nociceptores, que tendem a disparar potenciais de ação mais facilmente, de maneira que estímulos de intensidade menores se tornam capazes de disparar o potencial de ação. Este processo é chamado de sensibilização dos nociceptores. A sensibilização dos nociceptores é caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar para ativá-los, pelo aumento da atividade espontânea do neurônio e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos de baixa intensidade (Riedel & Neeck, 2001).

Ao contrário da nocicepção, que é considerada um fenômeno puramente iônico, a hiperalgisia é também um fenômeno metabólico por ativação de mecanismos acionados, por exemplo, a liberação de mediadores inflamatórios que modificam metabolicamente as condições normais de uma célula neuronal do sistema nervoso periférico (Snider & McMahon, 1998; Raja et al., 1999; Caterina & Julius, 2001; Lewin et al., 2004).

A sensibilização, além de alterar o limiar dos nociceptores polimodais, envolve também o recrutamento de novos nociceptores os quais se encontram inativos em condições fisiológicas. Estes nociceptores foram descritos como “receptores silenciosos” (Schaible & Schimidt, 1988).

Os seres vivos, durante a sua existência, estão expostos a diferentes tipos de agentes agressores, que podem ter origens física, química e/ou microbiana, e que são potencialmente fatais se não forem combatidos. No entanto, os organismos são dotados de complexos e eficientes sistemas de defesa que permitem combater a maioria destes agentes agressores. Neste sentido, o processo inflamatório desempenha importante papel, pois sua finalidade, de maneira geral, é restabelecer a homeostasia do tecido lesado, seja por diluir, destruir ou isolar o agente agressor (Gallin et al., 1992; Cronstein & Weissmann, 1993).

A inflamação é atualmente definida como um processo bioquímico e celular que acontece no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, as células circulantes, os vasos e os constituintes celulares e extracelulares deste tecido (Rote, 1998). Suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), migração celular e sensibilização ou ativação dos nociceptores. Essa resposta pode ser causada por trauma mecânico, privação de oxigênio ou nutrientes, alterações imunológicas ou genéticas, agentes químicos, microorganismos, temperaturas extremas ou radiação (Rote, 1998; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

Durante lesão tecidual, uma resposta de alarme precoce é estimulada pelas células residentes, principalmente macrófagos, células dendríticas e mastócitos,

que sinalizam a presença de estímulos deletérios para o organismo, levando a manifestação dos sinais da inflamação. Estes sinais são conhecidos como sintomas clássicos da inflamação e incluem o calor, o eritema, o edema, a dor e a perda de função (Appleton et al., 1996). Dentre estes, a dor, tema de interesse neste estudo, é um dos sintomas mais freqüentes na prática clínica e um dos problemas de tratamento mais importantes. Em algumas situações, pode ceder com a simples administração de medicamentos e, em outras, pode ser objeto de difícil terapêutica.

Conforme dito anteriormente, o mecanismo característico da hiperalgesia é a sensibilização dos nociceptores. Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de eicosanóides, que sensibilizam diretamente os nociceptores, sendo, por isso, chamados mediadores hipernociceptivos. Dentre os eicosanóides, estão as prostaglandinas (PGs), formadas pela ação da enzima ciclooxigenases (COX) (Ferreira & Vane, 1967).

Existem duas isoformas da enzima COX que são responsáveis pela produção de PGs. A COX-1 é expressa constitutivamente nas células. Esta isoforma é responsável pela produção de PGs que atuam em processos fisiológicos, como por exemplo, protegendo a mucosa gástrica pela diminuição da secreção ácida gástrica e pelo aumento da produção de muco (O'Neill, 1993). Já a COX-2 tem sua expressão seletivamente aumentada no cérebro após estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeo (LPS), interleucinas (IL)1 α e β e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Cao et al., 1997; Kömhoff et al., 1997; Majerus, 1998).

A participação das PGs na sensibilização dos nociceptores tem sido observada em humanos e animais, desde o século passado, com o uso de

técnicas eletrofisiológicas e comportamentais (Handwerker, 1976; Perl, 1976; Chahl & Iggo, 1977), além disso, várias evidências sugerem que principalmente as PGs do tipo E2 são responsáveis por induzir a hiperalgesia, fato que foi demonstrado primeiramente no homem por Ferreira (1972).

A hiperalgesia também pode ser produto da ativação de uma via independente de PGE2. Esta via é paralela à liberação de eicosanóides e depende da liberação de aminas simpatomiméticas. A administração intraplantar (i.pl.) de agonistas adrenérgicos, como a noradrenalina, a adrenalina, a isoprenalina ou a dopamina ou a administração i.pl. de aminas simpatomiméticas de ação indireta, como a tiramina, induzem hiperalgesia de intensidade semelhante às PGs, via ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e β -adrenérgicos (Nakamura & Ferreira, 1987). Além disso, Cunha et al. (1991) demonstraram que o tratamento com guanetidina (droga que induz a depleção de aminas endógenas periféricas), com antagonistas β -adrenérgicos ou com antagonistas de receptores dopaminérgicos é capaz de inibir a hipernocicepção induzida por IL-8. Os mesmos efeitos foram demonstrados em relação ao CINC-1 (do inglês cytokine-induced neutrophil chemoattractant) (Lorenzetti et al., 2002).

As descobertas das alterações associadas à resposta inflamatória, dos mediadores envolvidos no estabelecimento dessas alterações, bem como das drogas com atividade antiinflamatória têm sido possíveis em função da existência de vários modelos experimentais. Esses modelos podem diferir entre si quanto às células e aos mediadores envolvidos, alterações observadas, duração e magnitude das alterações e recuperação da função tecidual. Diferentes

substâncias de natureza exógena ou endógena podem ser usadas para induzir inflamação aguda ou crônica em animais experimentais.

O modelo de hiperalgesia induzida por carragenina tornou-se um dos mais usados. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales e induz sensibilização dos nociceptores para estímulos mecânicos (Kayser & Guilbald, 1987; Vinegar et al., 1987) e térmicos (Zhang et al., 1997; Osborne & Coderre, 1999), induz a migração celular de neutrófilos (Almeida et al., 1980; Vinegar et al., 1987; Pinheiro & Calixto, 2002), além de promover a manifestação de outras características da resposta inflamatória.

Outros mediadores que também são liberados durante a inflamação contribuem para a indução da hiperalgesia. Vários estudos demonstraram que as citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α induzem sensibilização dos nociceptores em vários modelos experimentais (Hrubey et al., 1991; Davis & Perkins, 1994; Perkins et al., 1995). Estudos caracterizaram a participação destas citocinas na gênese da hiperalgesia mecânica quando um estímulo inflamatório, como a carragenina, é administrado por via i.pl. (Cunha et al., 2005).

A participação da IL-1 β na hiperalgesia foi demonstrada, inicialmente por Ferreira et al. (1988), que descreveram que esta citocina induz hiperalgesia mecânica em patas de ratos quando administrada por via i.pl. Este efeito foi prevenido pelo pré-tratamento com indometacina, um antiinflamatório não-esteroidal que inibe a enzima COX e, conseqüentemente, a síntese de PGs e Txs, sugerindo que o componente prostaglandínico da hiperalgesia poderia ser ativado endogenamente pela liberação anterior de IL-1 β . O envolvimento da IL-1 β na

hiperalgesia induzida por carragenina também foi caracterizado. Outros trabalhos têm sugerido o mesmo mecanismo (Watkins et al., 1994; Sfieh-Gabedian et al., 1995). Por outro lado, Watkins et al. (1994) demonstraram que a administração intraperitoneal (i.p.) de LPS também produz hiperalgesia via liberação de IL-1 β , mas independente da liberação de PGs, uma vez que a hiperalgesia induzida pelo LPS não é inibida pela administração sistêmica de indometacina.

O efeito hiperalgésico obtido pela administração i.pl. de IL-6 também é prevenido com o tratamento com indometacina e, além disso, este efeito foi prevenido com a administração de soro contra IL-1. Estes dados sugerem a participação da IL-1 e a ativação da síntese de PGs na mediação química da hiperalgesia induzida por IL-6 (Cunha et al., 1992).

Em 1992, Cunha et al. demonstraram que a carragenina induz também a liberação de IL-8. Porém, contrariamente ao observado na hiperalgesia induzida por IL-1 β ou IL-6, a hiperalgesia induzida por IL-8 não é alterada pelo prétratamento com antiinflamatórios não-esteroidais e nem por soro anti-IL-1. Por outro lado, a administração de atenolol aboliu a hiperalgesia induzida por IL-8. Estes dados indicam que o efeito hiperalgésico desta citocina é dependente da ativação do componente simpático e independente da liberação de PGs.

Na seqüência, estudos demonstraram que o TNF- α antecede a liberação de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Anti-soros específicos para estas citocinas previnem parcialmente o efeito hiperalgésico do TNF- α . Além disso, este efeito hiperalgésico é completamente abolido pela associação de anti-soros específicos para IL-1 β e para IL-8 (Dinarello et al., 1986; Cunha, 1992; Lorenzetti et al., 2002). Em suma, o

TNF- α medeia a hiperalgesia em ratos pela estimulação dos componentes prostaglandínico e simpático.

Em relação à bradicinina (BK), uma cinina de origem plasmática, há evidências claras de sua participação em processos patológicos em que há lesão tissular e inflamação. Ferreira et al. (1993) demonstraram que estímulos como a carragenina ou LPS induzem processo hiperalgésico no qual a BK antecede a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. Contudo, doses elevadas de LPS (5 μ g/pata) induzem hiperalgesia que não é bloqueada pelo pré-tratamento com antagonista de receptores de BK, sugerindo que a liberação de TNF- α é direta. Curiosamente, estudos subseqüentes, realizados por Poole et al. (1999) confirmam a participação de BK na hiperalgesia via ativação dos receptores da BK (B1 e B2) e posterior a liberação de TNF- α .

Dessa maneira, cabe ressaltar que é possível controlar a dor inflamatória (hiperalgesia) através do uso de substâncias farmacológicas pertencentes a diferentes grupos que atuem especificamente sobre os receptores de BK, sobre a liberação ou ação das citocinas, sobre a síntese de PGs ou ainda inibindo a ativação do componente simpático.

Outros autores sugeriram a existência de uma cascata de liberação de citocinas mediando a hiperalgesia mecânica (avaliado pelo método de filamentos de von Frey) e térmica (avaliado no método de placa quente) (Safieh-Grabedian et al., 1995; Woolf et al., 1997). Além disso, a administração sistêmica de LPS (i.p.) induz sensibilização no modelo de retirada de cauda, mediada pela liberação de TNF- α via IL-1 β (Watkins et al., 1994 e 1995). Estes resultados sugerem fortemente que, em ratos, existe uma cascata de liberação de citocinas que

constitui uma ligação entre a injúria ou o estímulo inflamatório e a liberação dos mediadores finais da hiperalgesia. Entretanto, a liberação dos mediadores hiperalgésicos de forma hierárquica é controversa.

1.3. Receptores P2X

Os receptores P2X são uma família de canais de íons ligante-dependentes ativados por ATP extracelular que estão envolvidos nos mecanismos da dor. Foi descrito que a subunidade P2X3 é expressa nos neurônios aferentes primários e preferencialmente em fibras C (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995). A ativação do receptor P2X3 pelo ATP ou um agonista do ATP incia a despolarização, influxo de Ca^{2+} através do canal iônico acoplado ao receptor P2X3 e influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (Kennedy et al., 2003). Recentemente, muitos estudos utilizando modelos comportamentais nociceptivos com métodos de knockout (Cockayne et al. 2005)), oligonucleotídeos antisense (Barclay et al. 2002; Honore et al., 2002, Oliveira et al., 2009) e antagonistas seletivos de P2X3 e P2X2/3 (P2X3,2/3) (Jarvis et al. 2002; McGaraughty et al. 2003; Wu et al. 2004; McGaraughty et al. 2005; Sharp et al. 2006; Oliveira et al., 2009) indicam que a ativação dos receptores P2X3,2/3 pelo ATP endógeno contribui para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a administração de antagonistas dos receptores P2X3,2/3 no tecido periférico previne completamente a hiperalgesia induzida pela carragenina, mas não altera a liberação de IL-1 β , o que sugere que a liberação de prostaglandinas não é afetada (Oliveira et al., 2009). Baseado nesse fato, a prevenção da hiperalgesia induzida pela carragenina

através do antagonista do receptor P2X_{3,2/3} não pode ser explicada apenas pela diminuição nos níveis de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina.

Considerando que os receptores P2X_{3,2/3} são expressos predominantemente nas fibras nociceptivas (Chen et al. 1995; Lewis et al. 1995), nós testamos, nesse estudo, a hipótese de que a ativação dos receptores P2X_{3,2/3} neuronais pelo ATP endógeno participa da hiperalgesia induzida pela carragenina aumentando a susceptibilidade dos neurônios aferentes primários à ação da hiperalgesia causada pelos mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas.

Previous neuronal P2X3 receptor activation and PKC ϵ translocation are essential to the hyperalgesia mediated by prostaglandins and sympathetic amines during inflammation of peripheral tissue .

Filipe César do Prado¹

Dionéia Araldi¹

André Schwambach Vieira¹

Maria Cláudia Oliveira¹

Cláudia Herrera Tambeli²

Carlos Amílcar Parada^{1*}

1 Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP

2 Department of Physiological Sciences, Laboratory of Orofacial Pain, Piracicaba Dental School, State University of Campinas - UNICAMP

**** Corresponding author:***

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP

Monteiro Lobato, 255, Zip Code: 13083-862 Campinas, Sao Paulo - Brazil

Tel: + 55-19-35216195 Fax: +55-19-2106-5212

E-mail address: caparada@unicamp.br (C.A. Parada)

Abstract

We have recently demonstrated that blockade of P2X3 receptor in the peripheral tissue prevents carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. However, the mechanism by which the activation of neuronal P2X3 receptor contributes to the inflammatory hyperalgesia is not completely clear. The aim of this study was to test the hypothesis that the activation of neuronal P2X3 receptor contributes to carrageenan-induced mechanical hyperalgesia by increasing the susceptibility of primary afferent neurons to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathetic amines endogenously released in the site of inflammation.

Co-administration of the selective P2X3 receptor antagonist A317491 (60 µg/paw) or pre-treatment with dexamethasone (1 mg/mL/Kg), prevented the mechanical hyperalgesia measured 3 hours after the administration of carrageenan (300 µg / paw). αβmeATP (50 µg/paw) induced mechanical hyperalgesia 1 but not 3 hours after its administration that was also prevented by dexamethasone or A317491. Administration of sub-threshold doses of PGE₂ (4 ng/paw) or dopamine (0.4 µg/paw) immediately after the administration of αβmeATP or carrageenan in rats pretreated with dexamethasone induced maximal hyperalgesia 3 hours later.. These hyperalgesic states (“priming”) revealed by sub-threshold doses of PGE₂ or dopamine were prevented by A317491 or treatment with ganglionar administrations (DRG-L5) of ODN antisense, but not ODN mismatch, against P2X3 receptor (40 µg /5µL once a day for 4 days). ODN antisense, but not ODN mismatch significantly reduced the expression of P2X3 receptors in the saphenous nerve and in DRG-L5. Administration of a PKC_ε translocation inhibitor (1 µg/paw) in peripheral tissue 45

min. before $\alpha\beta$ meATP or PGE₂ (100 ng/paw) prevented the hyperalgesic state induced by $\alpha\beta$ meATP ("priming"), but not the mechanical hyperalgesia induced by PGE₂ (100 ng/paw) indicating that PKC ϵ mediates this hyperalgesic state.

The findings of this study suggest that mechanical inflammatory hyperalgesia depends on neuronal activation of P2X3 receptor and the subsequent PKC ϵ translocation, which increases the susceptibility of primary afferent neurons (priming) to others inflammatory mediators such as PGE₂ and symphatetic amines.

Keywords: mechanical inflammatory hyperalgesia, P2X3 and P2X2/3 receptors, ATP, carrageenan, priming, antisense.

1. Introduction

P2X receptors are a family of ligand-gated ion channels activated by extracellular ATP that are involved in pain mechanisms. The P2X3 receptor subunit is expressed on primary afferent neurons preferentially on C-fibers (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995). The activation of P2X3 receptor by ATP or by its agonists initiates depolarization, Na^{2+} influx through the ionic channel coupled to P2X3 receptor and Ca^{2+} influx via the co-expressed voltage-dependent Ca^{2+} channels (Kennedy et al., 2003). Therefore, local administration of the P2X3 receptor agonist $\alpha\beta\text{metATP}$ in the peripheral tissue induces a brief nociceptive behavior followed by a sensitization of the primary afferent neuron (McGaraughty et al. 2005; Oliveira et al., 2009).

Recently, many reports using behavioral nociceptive models with gene knockout methods (Cockayne, Dunn et al. 2005), antisense oligonucleotide technologies (Honore et al., 2002, Oliveira et al., 2009) and selective P2X3 and P2X2/3 (P2X3,2/3) receptors antagonists (Jarvis, 2002; McGaraughty et al., 2003; Oliveira et al., 2009) indicate that the activation of P2X3 receptors by endogenous ATP contributes to the development of inflammatory hyperalgesia induced by carrageenan.

The subcutaneous administration of carrageenan has been widely used as a model of inflammatory hyperalgesia because similarly to many inflammatory pain conditions in humans, it induces the release of prostaglandins and the development of hyperalgesia that is reduced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Moncada, et al. 1973; Ferreira et al. 1974). In fact, carrageenan-induced

hyperalgesia is mediated by prostaglandins and sympathetic amines, which directly sensitize the primary afferent neurons. Therefore, the hyperalgesia induced by carrageenan is completely prevented by the combination of a NSAID, such as indomethacin with a β -adrenergic receptor antagonist, such as atenolol (Ferreira et al., 1993; Parada et al. 2005).

We have recently demonstrated that while the local administration of P2X_{3,2/3} receptors antagonists in the peripheral tissue completely prevents carrageenan-induced hyperalgesia, it does not alter the level of IL-1 β in the peripheral tissue, suggesting that the release of prostaglandin may not be affected (Oliveira et al., 2009). Based on that, the blockade of carrageenan-induced hyperalgesia by P2X_{3,2/3} receptor antagonist cannot be explained only by a decrease of inflammatory mediators level, such as prostaglandins.

Considering that the P2X₃ receptor is predominantly expressed on nociceptive C fibers (Chen et al. 1995; Lewis et al. 1995), we tested the hypothesis that the activation of neuronal P2X₃ receptor contributes to carrageenan-induced mechanical hyperalgesia by increasing the susceptibility of primary afferent neurons to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathetic amines endogenously released in the site of inflammation.

2. Methods

2.1. Drugs and doses

The following drugs were used: carrageenan (Cg; 300µg/paw, Oliveira, 2009); the selective P2X3 and P2X2/3 receptor antagonist, 5-([(3-Phenoxybenzyl) [(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1naphthalenyl] [amino]carbonyl)-1,2,4-benzene- tricarboxylic acid (A-317491; 60µg/paw, Oliveira, 2009), the non-selective P2X3 receptor agonist α,β methylene-ATP ($\alpha\beta$ MeATP; 50µg/paw); prostaglandin E₂ (PGE₂; 4, 20 and 100µg/paw); dopamine (dopa; 0,4, 2 and 10µg/paw), dexamethasone (dexa; 1mg/kg, Schuligoi et al., 2003) and PKC ϵ ν_{1-2} peptide (an inhibitor of PKC ϵ translocation; 1 µg/paw, Parada et al., 2003). The drugs were obtained from Sigma Chemicals (St Louis, Missouri, USA). All drugs were dissolved in saline (0.9% NaCl), except PGE₂ and dexamethasone, which were also previously dissolved in ethanol.

2.2. Subjects

Male albino Wistar rats weighing 200 – 350g obtained from CEMIB/UNICAMP (Centro de Bioterismo - State University of Campinas -.UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) were used. Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP on using laboratory animals (Zimmerman, 1983). All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the State University of Campinas - Unicamp. Animals were housed in plastic cages with soft bedding (five/cage) on a 12:12 light cycle (lights on at 07:00 A.M.) with food and water

available *ad libitum*. They were maintained on a temperature-controlled room ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) for a 1-hour habituation period prior to the test.

2.3. Subcutaneous Injections

Drugs or their vehicle were subcutaneously injected in the dorsum of the rat's hind paw by tenting the skin and puncturing it with a 30-gauge needle prior to injecting the test agent, as previously described (Oliveira, 2007). The needle was connected to a catheter of polyethylene and also to a Hamilton syringe (50 μl). The animals were briefly restrained and the total volume administered in the paw was 50 μl .

2.4. Intraganglionic injections

The method for intraganglionic ODN injection was based on the technique of Ferrari and colleagues (Ferrari et al., 2007). Briefly, for each injection rats were anesthetized with 1/3 O_2 – 2/3 N_2O and halothane at 5 and 1.5%, respectively (Le Bars, 1979). The injecting needle was prepared by inverting the position of a gingival needle (30G) relative to its plastic syringe connector, which was tightly connected to the metal piece. The point of skin puncture was defined at 1.5 cm laterally to the vertebral column, about 0.5 cm caudal from a virtual line passing over the rostral borders of the iliac crests. In order to facilitate the penetration of the injecting needle through the skin, an initial puncture with a larger needle (25 $\times$ 10, 19G) was made. In sequence, the injecting needle was inserted through the punctured skin, towards the inter-vertebral space between the fifth and sixth lumbar vertebrae, until the tip touched the lateral region of the vertebrae. To reach

the space between the transverse processes of the fifth and sixth vertebrae, delicate movements of the needle were made until the bone resistance was diminished and a paw flinch reflex, which was used as a sign that the needle penetrated the DRG, was observed.

2.5. Mechanical nociceptive threshold test

Testing sessions took place during light phase (between 09:00 A.M. and 5:00 P.M.) in a quiet room maintained at 23°C (Rosland 1991). The Randall-Selitto nociceptive paw-withdrawal flexion reflex test (Randall & Selitto, 1957) was performed using an Ugo-Basile analgesymeter (Stoelting, Chicago, IL, USA), which applies a linearly increasing mechanical force to the dorsum of the rat's hind paw (Oliveira, 2007). The nociceptive threshold was defined as the force in grams, which the rat withdrew its paw. The baseline paw-withdrawal threshold was defined as the mean of three tests performed at 5-min intervals before test agents were injected. Mechanical hyperalgesia was quantified as the change in mechanical nociceptive threshold calculated by subtracting the mean of three mechanical nociceptive threshold measurements taken after injection of the test agent from the mean of the three baseline measurements.

2.6. Antisense oligodeoxynucleotides (ODNs)

The functional blockade of P2X3 receptors expression on peripheral sensory neurons was realized by the intraganglionar injection of ODN antisense. The followed ODN antisense sequence of 19-mer was used: 5'-T A A T C C G A C A C G T C C A T G A -3' (Oliveira et al., 2009). The mismatch-

ODN sequence, 5'-T A T T C C **C A C T C G A C G A T C A** -3', corresponded to the antisense sequence except that six bases were changed (denoted by bold face). The corresponding GenBank accession number and ODN position within the cDNA sequence are X90651 and 401-420. A search of the NCBI database to *Rattus norvegicus* identified no other sequences homologous to that used in this experiment. The ODN was purchased from Erviegas (SP, Brazil), lyophilized and reconstituted in 0.9% NaCl. The ODN was aliquoted and stored at -20°C.

2.7. Western blot analysis of P2X3 receptor expression

Five animals in each group were used for immunoblot study. To assess the efficacy of antisense ODN treatment, immediately after the behavioral test the dorsal root ganglion L5 and a 1.0 cm section of saphenous nerve of anesthetized rats were removed 1.5 cm proximal to the knee-level bifurcation and separated in two pools of samples, to allow detectable levels of protein. For total protein, samples were homogenized in 1% Triton X-100, 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma), 7 M urea, and 2 M thiourea, (10% w/v). Sample homogenization was carried out at 4°C using a Ultrasonic Homogenizer for 5 sec. Insoluble materials were removed by centrifugation (12,000g, 4°C, 15 min). The protein concentration was determined by using Bradford method with bovine serum albumin as the standard. Aliquots containing 70µg total protein were boiled in loading Laemmli buffer (BioRad, USA); thereafter, each aliquot was loaded onto an 8% polyacrylamide gel. After electrophoresis separation, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membrane was

blocked in PBS-Tween containing 5% non-fat dry milk at room temperature, followed by incubation with P2X3 rabbit polyclonal IgG (1:500; Neuromics) overnight at 4°C, rinsed six times with TBST, and then incubated for 40min in goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (1:3000, Sigma). Membrane was visualized using ECL solution (Pierce), and exposure to x-ray film (Kodak) in a dark room. Films were scanned into Image Quant 5.2 for analysis. Banding specificity was determined by omission of primary antibody from the Western blot protocol. In the four western blot analysis, to compensate for any differences in the amount of loaded protein, the intensity of the P2X3 receptor band was compared with the colored acrylamide gel, showing all bands of the gel with the same intensity of coloration. These data were analyzed by paired t-test (Oliveira et, 2009)

2.8. Statistical analysis

For all figures, one way ANOVA or t-test was performed to determine the basis of significant difference. If there was a significant between-subjects main effect of treatment group, post-hoc contrasts, using the Bonferroni test, were performed to determine the basis of the significant difference. Data are expressed in figures by the decrease with paw-withdrawal threshold and presented as means $\pm$ S.E.M.

3. Results

3.1. The selective P2X3 receptor antagonist A-317491 or dexamethasone prevented the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia.

As showed in figure 1, the subcutaneous administration of carrageenan (300µg/paw) in the dorsum of rats' hind paw induced mechanical hyperalgesia measured 3h after its administration ($p<0.05$, ANOVA, Bonferroni test). Co-administration of the selective P2X3 and P2X2/3 receptors antagonist A-317491 (60µg/paw) with carrageenan (300µg/paw) completely prevented carrageenan-induced mechanical hyperalgesia ($p<0.05$, ANOVA, Bonferroni test). Because carrageenan induces mechanical hyperalgesia by the summation of prostaglandin- and sympathetic amines-induced mechanical hyperalgesia (for review see Verri et. al, 2006), we tested whether the magnitude of the blockage of carrageenan-induced mechanical hyperalgesia by A-317491 (60µg/paw) is similar to effect of dexamethasone systemically administrated (1 mg/Kg), which completely prevents the carrageenan-induced inflammatory response. As showed in figure 1, dexamethasone completely prevented the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia at the same magnitude of A-317491 ($p<0.05$, ANOVA, Bonferroni test). The administration of A-317491 in the contralateral hind paw did not prevent the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia ruling out its systemic (Fig.1, ANOVA, Bonferroni test).

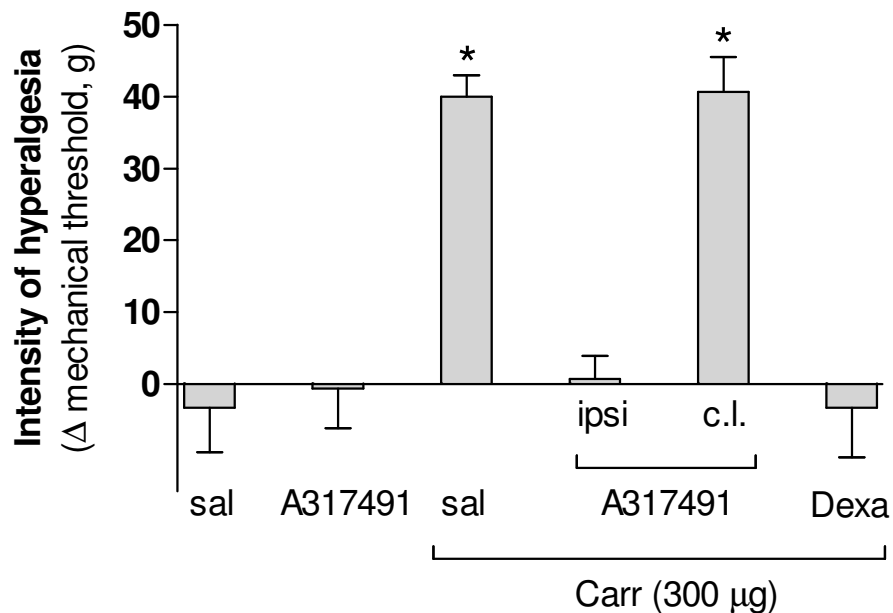


Fig. 1. Effect of the A-317491 or dexamethasone on the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. The selective P2X3 and P2X2/3 receptors antagonist A-317491 (60μg/paw) co-administrated in the ipsilateral (ipsi) but not in the contralateral (c.l.) hind paw with carrageenan (300μg/paw) completely prevented the mechanical hyperalgesia measured 3 h after their injections. Dexamethasone (Dexa; 1mg/ml/kg, s.c.) administrated 1 h before carrageenan also prevented the mechanical hyperalgesia. The same doses of A-317491 and dexamethasone were used in subsequent experiments. The symbol “*” indicates responses significantly greater than that induced by NaCl 0.9% (sal) ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test).

3.2. Administration of $\alpha\beta$ meATP in the peripheral tissue induced short mechanical hyperalgesia that depends on release of inflammatory mediators.

As showed in the figure 2, the administration $\alpha\beta$ meATP (50μg/paw) induced mechanical hyperalgesia 1h but not 3h after its administration ($p < 0.05$ ANOVA,

Bonferroni test). Pre-treatment with dexamethasone (1mg/kg, 1h, s.c.) prevented the $\alpha\beta$ meATP-induced mechanical hyperalgesia measured 1h after its administration ($p<0.05$, ANOVA, Bonferroni test).

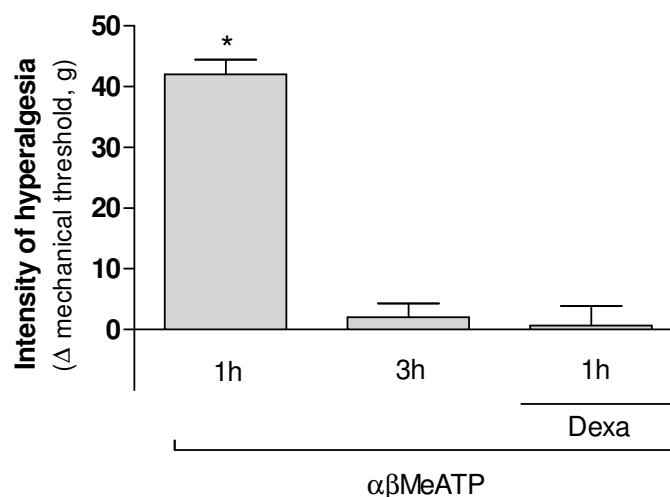


Fig. 2. Activation of $P2X_{3,2/3}$ receptors induced short mechanical hyperalgesia that depends on release of inflammatory mediators. $P2X_{3,2/3}$ receptors agonist, $\alpha\beta$ meATP (50 μ g/paw) induced a transient mechanical hyperalgesia 1h after its administration that was completely resolved 3h after its administration and prevented by dexamethasone.

3.3. Activation of $P2X_3$ receptors increases the susceptibility to PGE_2 or Dopamine-induced mechanical hyperalgesia.

Because our previous findings demonstrated that the blockage of carrageenan-induced mechanical hyperalgesia cannot be totally explained by

decrease of the inflammatory mediators levels (Oliveira et al., 2009), we tested the hypothesis that the activation of P2X3 and P2X2/3 receptors is important to prostaglandin- and sympathetic amines-induced mechanical hyperalgesia.

Subcutaneous administration of PGE₂ (4, 20 or 100ng/paw, Fig 3, panel A) or dopamine (0.4, 2 or 10µg/paw, Fig 3, panel B) induced a dose-related mechanical hyperalgesia measured 3h after their administrations. The subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4µg/paw), did not differ from saline administration (50 µL; ANOVA, Bonferroni test). The co-administration of αβMeATP (50µg/paw) with the subthreshold doses of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4µg/paw) induced mechanical hyperalgesia measured 3h after their administration (Fig. 3, panel C and panel D, respectively, $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni test). Although, αβMeATP did not induce mechanical hyperalgesia 3h after its administration, rats were treated with dexamethasone to avoid any effect of endogenous inflammatory mediators. Dexamethasone (1mg/kg, 1h, s.c.) did not affect the mechanical hyperalgesia induced by the co-administration of αβMeATP with the subthreshold doses of PGE₂ or dopamine (Figure 3, panel C and D, respectively).

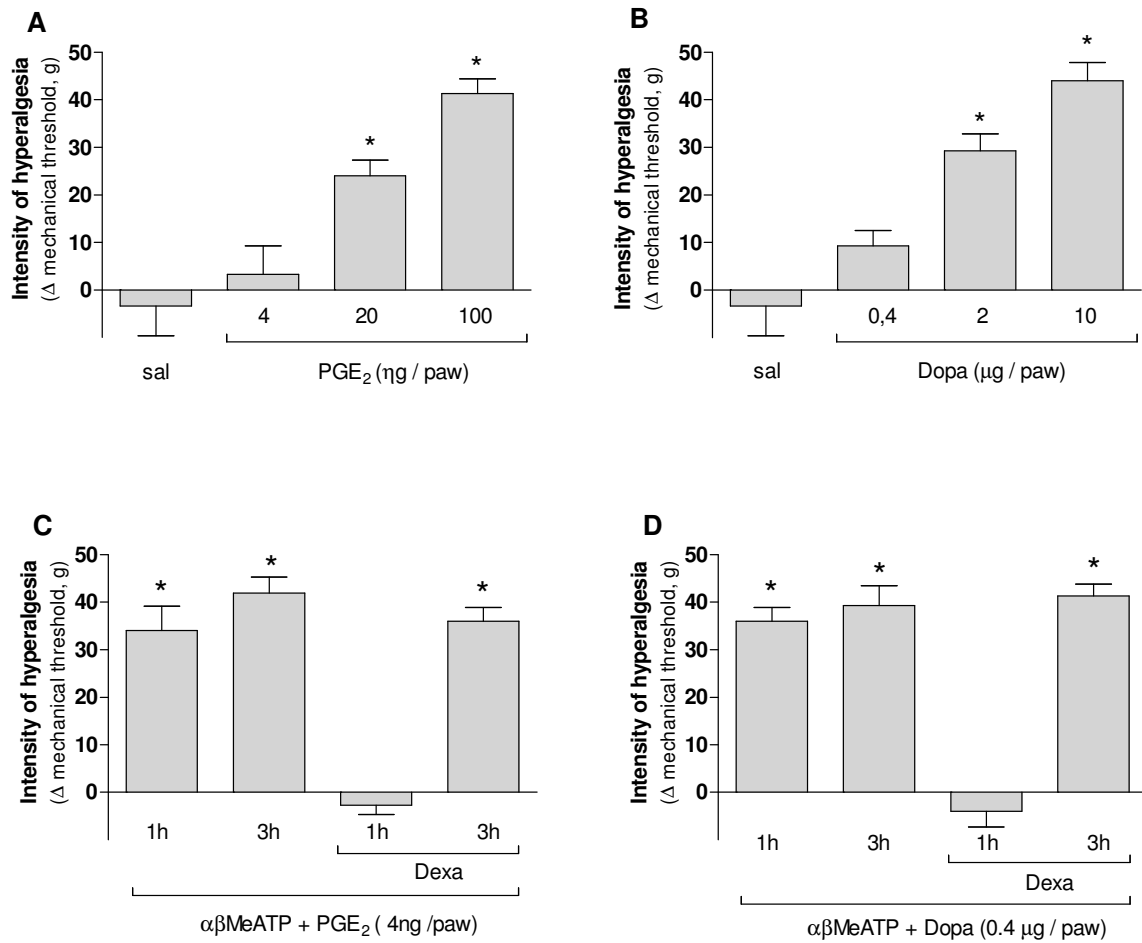


Fig. 3. Activation of neuronal P2X3 receptor increases the susceptibility of PGE₂ and Dopamine to induce mechanical hyperalgesia. The administration of PGE₂ (4, 20 or 100ng/paw) or dopamine (0.4, 2 or 10μg/paw) induced dose-related mechanical hyperalgesia measured 3h after their administration (**panels B and C**, respectively). The co-administration of αβmeATP (50μg/paw) with subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw, **panel D**) or dopamine (0.4μg/paw, **panel E**) induced maximal mechanical hyperalgesia measured 3h after their administrations that was not affected by dexamethasone (1 mg/mL/kg). The symbol “*” indicates responses significantly greater than that induced by other groups (p<0,05, ANOVA, Bonferroni test).

3.4. Release of endogenous ATP and P2X3 receptor activation increases the susceptibility to PGE₂ or Dopamine-induced mechanical hyperalgesia.

Because $\alpha\beta$ meATP is not the endogenous ligand of P2X3 and P2X2/3 receptors, we verified whether endogenous release of ATP by the inflammatory agent, carrageenan, activates P2X3, increasing the susceptibility of primary afferent neurons to PGE₂ or dopamine-induced mechanical hyperalgesia (hyperalgesic priming). Rats are treated with dexamethasone (1 mg/Kg, s.c.) and subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4 μ g/paw) were co-administrated with carrageenan (DOSE). Although neither carrageenan nor the subthreshold doses of PGE₂ or dopamine induced mechanical hyperalgesia when administrated alone, the co-administrations induced maximal mechanical hyperalgesia measured 3h after their administrations (figure 4; $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni test). To demonstrate that the hyperalgesic priming induced by carrageenan is associated with P2X3 and P2X2/3 receptor activation, subthreshold doses of PGE₂ or dopamine- was co-administrated with carrageenan and the P2X3 and P2X2/3 receptor antagonist, A-317491 (60 μ g/paw). The co-administration of A-317491 completely prevented the mechanical hyperalgesia induced by the subthreshold doses of PGE₂ or dopamine (hyperalgesic priming) measured 3h after their administrations (figure 4; $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni test).

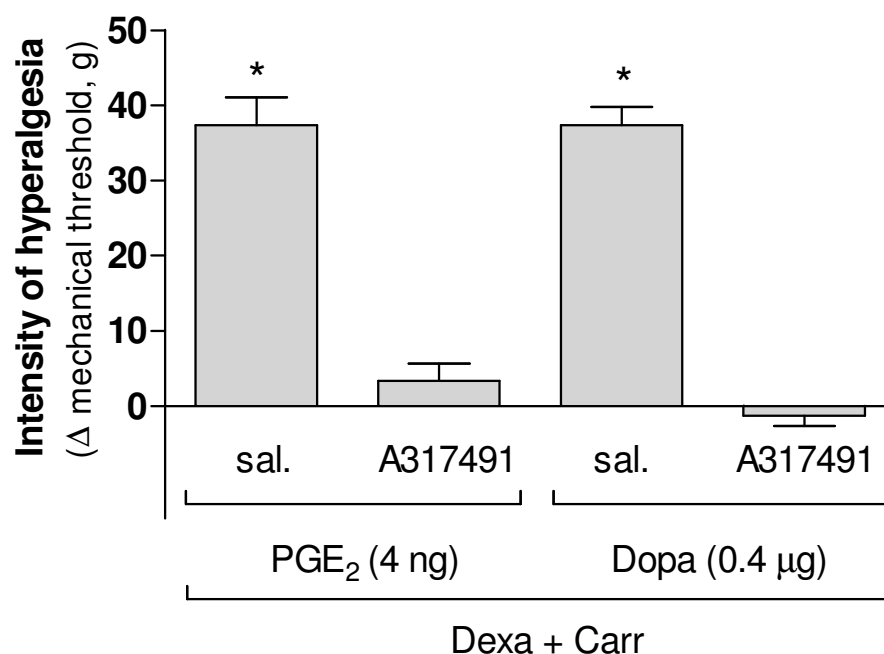


Fig.4. Endogenous release of ATP and P2X P2X2/3 receptor activation in not sensitized tissue enhances the susceptibility of PGE₂ and dopamine to induce mechanical hyperalgesia. Dexamethasone (1mg/mL/kg) completely prevented the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, but not altered the mechanical hyperalgesia induced by its co-administration with the subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4μg/paw) measured 3 h after their administrations. The co-administration of A-317491 (60μg/paw) with carrageenan prevented the subthreshold dose of PGE₂- or dopamine-induced mechanical hyperalgesia in rats pre-treated with dexamethasone. The symbol “*” indicates responses significantly greater than that of other groups (p<0,05, ANOVA , Bonferroni test)

3.5. Intraganglionar ODN antisense against P2X3 receptor prevented the increase of susceptibility to PGE₂ or Dopamine-induced mechanical hiperalgesia.

Because A-317491 is a selective P2X3 and P2X2/3 receptor antagonist, to confirm that the activation of P2X3 receptor of primary afferent neurons is important to increasing its susceptibility to inflammatory mediators-induced hyperalgesia (hyperalgesic priming), rats were treated with ODN antisense or mismatch against P2X3 receptor (40µg/5µl/day, i.g.l., 4 days) and dexamethasone (1mg/kg, s.c.) 1h before carrageenan. As showed in figure 5 (panel A), ODN antisense, but not mismatch, completely prevented the subthreshold dose of PGE₂- or dopamine-induced mechanical hyperalgesia ($p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni test). Furthermore, ODN antisense, but not mismatch, reduced the P2X3 receptor expression on L5 ganglion and on saphenous nerve (Figure 5, panel B, $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni test). As showed in the figure 5 (panel A), treatment with intraganglionar administration of ODN (40µg/5µl/day, i.g.l., 4 days) did not change by itself the mechanical nociceptive threshold measured before the administration of carrageenan.

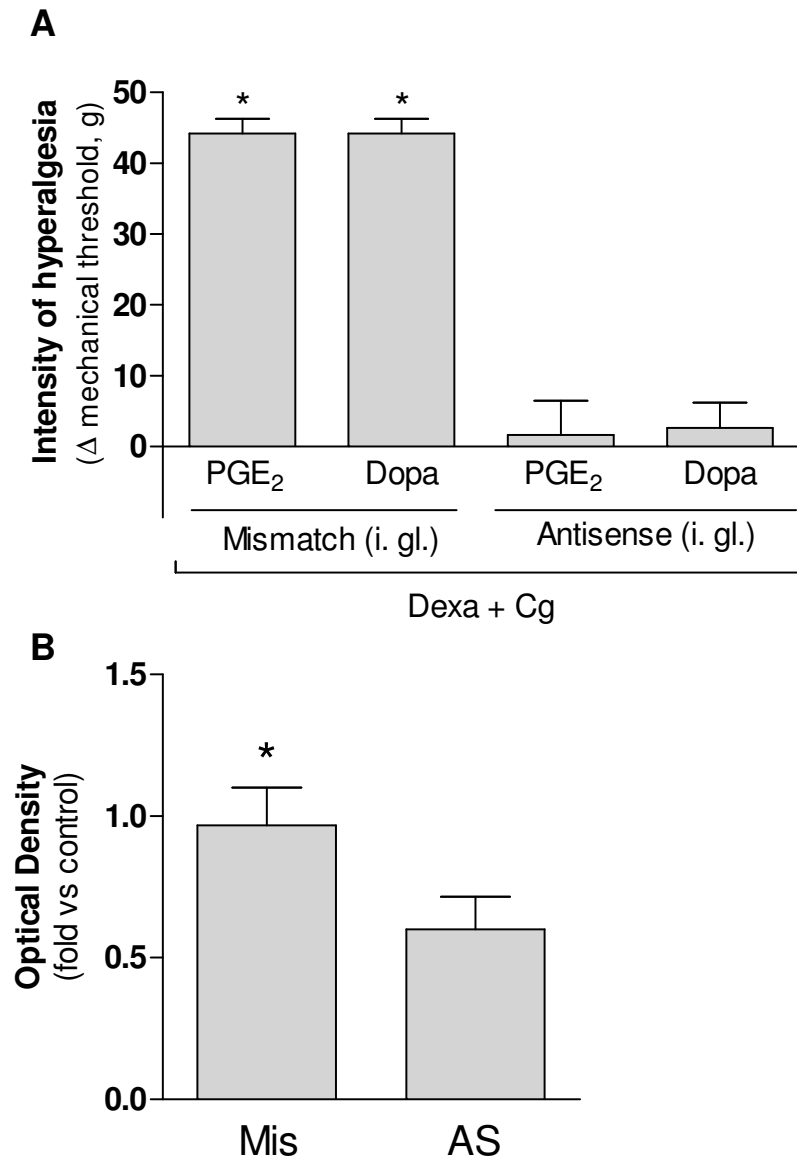


Fig.5. Endogenous release of ATP and neuronal P2X3 receptor activation in not sensitized tissue enhances the susceptibility of PGE₂ and dopamine to induce mechanical hyperalgesia. The pre-treatment with ODN antisense against P2X3 receptor, but not mismatch (40μg/5μl/day, i.g, for 4 days) significantly reduced the mechanical hyperalgesia induced by the subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4μg/paw) co-administrated with carrageenan (300 μg/paw) in hind paw of rats pre-treated with dexamethasone (1mg/mL/Kg), and measured 3 h after their administrations.

(panel A). ODN antisense (AS), but not mismatch (M), reduced the P2X3 receptor expression on saphenous nerve (panel B). The symbol “*” indicates responses significantly greater than that of other groups ($p < 0,05$, ANOVA , Bonferroni test or t-test).

3.6. Acute hyperalgesic priming mediated by P2X3 receptor activation depends on PKC ϵ

We also verified whether PKC ϵ is important to increasing the susceptibility of primary afferent neurons to inflammatory mediators-induced hyperalgesia (hyperalgesic priming). The co-administration of carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$) with subthreshold dose of PGE $_2$ (4 ng/paw) or dopamine (0.4 $\mu\text{g/paw}$) did not induce mechanical hyperalgesia measured 3h after their administrations in hindpaw of rats pre-treated with dexamethasone (1 mg/mL/kg; 1h before) and PKC ϵ inhibitor (1 $\mu\text{g/paw}$; 45 min before), but not with dexamethasone and saline. PKC ϵ inhibitor administrated 45 min before PGE $_2$ (100 ng/paw) or Dopamine (10 $\mu\text{g/paw}$) did not alter the mechanical hyperalgesia measured 3 hours after its administration (figure 6).

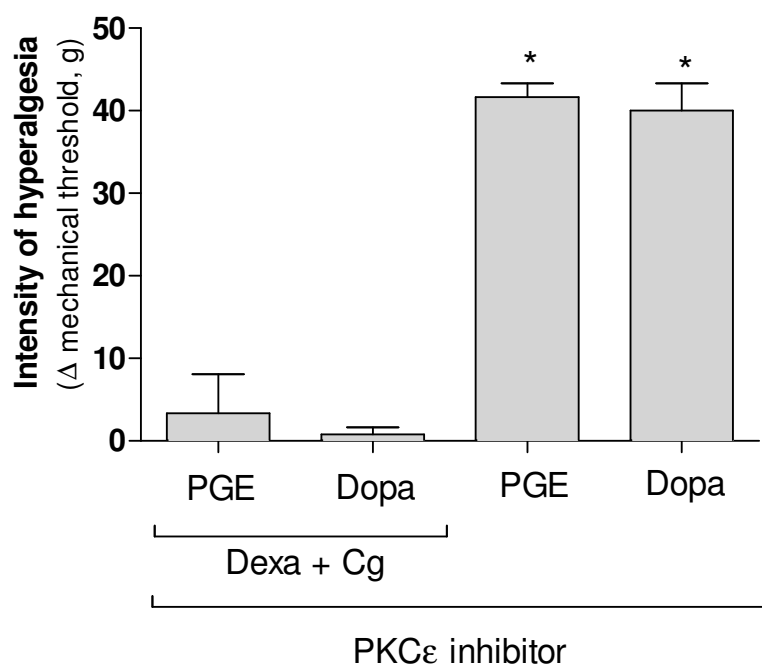


Fig. 6. *Acute hyperalgesic priming mediated by P2X3 receptor activation depends on PKC ϵ .* The pre-treatment with PKC ϵ inhibitor (1 μ g/paw; 45 min before) reduced the hyperalgesia induced by the subthreshold dose of PGE₂ (4ng/paw) or dopamine (0,4 μ g/paw) co-administrated with carrageenan (300 μ g/paw) in hind paw of rats pre-treated with dexamethasone (1 mg/mL/kg). The symbol “*” indicates responses significantly greater than that of other groups ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni test or t-test).

4. Discussion

In this study, we have shown that activation of peripheral neuronal P2X3 receptors by endogenous ATP released during the inflammation of peripheral tissue increases the susceptibility of primary afferent neurons to other hyperalgesic mediators, such as prostaglandin E₂ and sympathetic amines. Specifically, we have found that subthreshold dose of PGE₂ (4 ng/paw) or dopamine (0.4 µg /paw), that is, doses that did not induce mechanical hyperalgesia when administered alone, induced mechanical hyperalgesia at same magnitude of their maximal doses when co-administered with the inflammatory agent carrageenan or with the P2X_{3,2/3} receptor agonist αβmeATP. Although it has been described that αβmeATP is an agonist of P2X₁, P2X₃ and P2X_{2/3} receptors (Rongen et. Al., 1997), the involvement of P2X₁ seems to be unlikely because only small amount of P2X₁ mRNA is found in dorsal root ganglia (Lewis et. Al., 1995; Collo et. Al., 1996). Furthermore, it has been demonstrated that IP5I, a potent and selective P2X₁ receptor antagonist is ineffective at reducing inflammatory pain (Honore, Mikusa et al. 2002).

It has been demonstrated that carrageenan induces the release of the cytokine IL-1β (Ferreira et al., 1988; Oliveira et al., 2009), which in turn, induces the release of prostaglandins (Ferreira et al., 1988). Recently we demonstrated that the local administration of the selective P2X_{3,2/3} receptors antagonist A-317491 in the peripheral tissue prevents the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (Oliveira et al., 2009) but does not affect the release of IL-1β in the peripheral tissue challenged with carrageenan (Oliveira et al., 2009). Therefore, this finding suggests that the release of prostaglandins is not reduced by A-317491. Since it is generally

accepted that prostaglandins directly sensitize primary afferent neurons, the complete inhibition of carrageenan-induced hyperalgesia by A-317491 cannot be explained by the decrease of prostaglandins levels.

Based on these data, a series of experiments were performed to investigate whether neuronal P2X3 receptor activation contributes to the hyperalgesia induced by prostaglandins or sympathetic amines that directly sensitize nociceptors. Our findings demonstrated that neuronal P2X3 receptor activation increases the susceptibility of primary afferent neurons to PGE₂- or dopamine-induced hyperalgesia. This “primed” state of the neuron seems to be essential to the development of inflammatory hyperalgesia in peripheral tissue. In fact, the results of the present study demonstrated that a dose of PGE₂ or dopamine that did not induce hyperalgesia when administered alone, induced hyperalgesia in the “primed” state at the same magnitude of that induced by the maximal doses of these mediators when administered alone.

It is important to point out that the transient hyperalgesia induced by $\alpha\beta$ meATP is not associated to the increased susceptibility of the primary afferent neurons to the hyperalgesia induced by other inflammatory mediators, because dexamethasone prevented carrageenan- or $\alpha\beta$ meATP-induced hyperalgesia, but not the priming. These findings suggest that dexamethasone blocks the endogenous release of inflammatory mediators, but does not affect the release of ATP. In addition, while $\alpha\beta$ meATP induced hyperalgesia only 1 hour after its administration, the acute hyperalgesic priming induced by $\alpha\beta$ meATP persisted 3 hours after its administration.

Carrageenan-induced hyperalgesia is mediated by both prostaglandins and sympathetic amines because the local administration of COX inhibitors or β -adrenoceptor antagonists reduces the carrageenan-induced hyperalgesia by 50% (Cunha, Lorenzetti et al. 1991; Cunha, Poole et al. 1992). In this study we reproduced our previous findings that P2X_{3,2/3} receptors antagonists prevent the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (Oliveira et al., 2009), confirming that P2X_{3,2/3} receptor activation by endogenous ATP is essential to the development of the sensitization of the primary afferent neuron induced by prostaglandins and sympathetic amines.

It has been described that P2X₃ receptors are predominantly expressed on primary afferent fibers (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995;). Intrathecal administration of ODN antisense against P2X₃ reduces the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (Oliveira et al., 2009). Because activation of P2X_{3,2/3} receptor in the spinal cord also collaborates to the development of inflammatory hyperalgesia, in this study, ODN antisense against P2X₃ was administrated in the DRG-L5 ganglion. Our finding demonstrated that ODN antisense against P2X₃ receptor prevented the hyperalgesia induced by a subthreshold dose of PGE₂ or dopamine in the rat's hindpaw "primed" with carrageenan. This finding confirms that the activation of neuronal P2X₃ receptor activation in peripheral tissue is important to the development of inflammatory hyperalgesia by increasing the susceptibility of the primary afferent neuron to other inflammatory mediators, such as prostaglandins and sympathetic amines.

We also demonstrated that this acute hyperalgesic “priming” depends on PKC ϵ activation. Moreover, the hyperalgesia induced by PGE $_2$ administrated in the subcutaneous tissue also depends on PKC ϵ , which is later activated, at least 180 min after PGE $_2$ administration (Sachs et al., 2009). Based on that, in this study, the PKC ϵ_{V1-2} peptide that reversibly inhibits PKC ϵ translocation (Gray et al., 1997) was locally administrated in the subcutaneous tissue 45 minutes before PGE $_2$, but co-administrated with carrageenan. Although the dose of 1 μ g of PKC ϵ inhibitor locally administrated in the subcutaneous tissue did not alter the hyperalgesia induced by a sub-maximal dose of PGE $_2$ (100 ng) in normal paws (Sachs et al., 2009) it inhibited the hyperalgesia induced by a subthreshold dose of PGE $_2$ (4 ng) in “primed” paws. This finding suggests that the involvement of PKC ϵ in this hyperalgesic “priming” is associated a signaling pathway different from that involved in PGE $_2$ -induced hyperalgesia.

In summary, the data of the present study demonstrated that neuronal P2X3 receptor activation is essential to the mechanical hyperalgesia induced by the endogenous release of prostaglandins or sympathetic amines. These findings suggest that during an inflammatory process of the peripheral tissue neither prostaglandins nor sympathetic amines are able to sensitize primary afferent neuron by themselves, a previous PKC ϵ activation is necessary.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Capes and FAPESP, Brazil.

References

Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, Abdel'al S, Natt F, Hall J, Winter J, Bevan S, Wishart W, Fox A, Ganju P. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci* 2002;22(18):8139-8147.

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995;377(6548):428-431.

Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford AP. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 2005;567(Pt 2):621-639.

Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 1996;16(8):2495-2507.

Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 1991;104(3):765-767.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992;107(3):660-664.

Ferrari LF, Cunha FQ, Parada CA, Ferreira SH. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. *J Neurosci Methods* 2007;159(2):236-243.

Ferreira SH, Cunha FQ, Lorenzetti BB, Michelin MA, Perretti M, Flower RJ, Poole S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1997;121(5):883-888.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 1988;334(6184):698-700.

Ferreira SH, Moncada S, Parsons M, Vane JR. Proceedings: the concomitant release of bradykinin and prostaglandin in the inflammatory response to carrageenin. *Br J Pharmacol* 1974;52(1):108P-109P.

Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. Role of a Ca(2+)-dependent slow afterhyperpolarization in prostaglandin E2-induced sensitization of cultured rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 1996;205(3):161-164.

Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt AT, Johnston JF, Wyatt JR, Faltynek CR, Jarvis MF, Lynch K. Analgesic profile of intrathecal P2X₃ antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* 2002;99(1-2):11-19.

Honore P, Mikusa J, Bianchi B, McDonald H, Cartmell J, Faltynek C, Jarvis MF. TNP-ATP, a potent P2X₃ receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain* 2002;96(1-2):99-105.

Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17179-17184.

Kennedy C, Assis TS, Currie AJ, Rowan EG. Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics. *J Physiol* 2003;553(Pt 3):683-694.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 1979;6(3):283-304.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995;377(6548):432-435.

Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw* 2002;13(4):456-461.

McGaraughty S, Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, McDonald HA, Bianchi B, Faltynek CR, Jarvis MF. Endogenous opioid mechanisms partially mediate P2X₃/P2X_{2/3}-related antinociception in rat models of inflammatory and chemogenic pain but not neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2005;146(2):180-188.

McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF. Effects of A-317491, a novel and selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 2003;140(8):1381-1388.

Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature* 1973;246(5430):217-219.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, Tambeli CH. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. *Neuroscience* 2007;145(2):708-714.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain* 2009;141(1-2):127-134.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111(4):409-419.

Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)* 1997;92(1):13-24.

Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain* 1991;45(2):211-216.

Rush AM, Waxman SG. PGE₂ increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Res* 2004;1023(2):264-271.

Schuligoi R, Ulcar R, Peskar BA, Amann R. Effect of endotoxin treatment on the expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin synthases in spinal cord, dorsal root ganglia, and skin of rats. *Neuroscience* 2003;116(4):1043-1052.

Sharp CJ, Reeve AJ, Collins SD, Martindale JC, Summerfield SG, Sargent BS, Bate ST, Chessell IP. Investigation into the role of P2X₍₃₎/P2X_(2/3) receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study. *Br J Pharmacol* 2006;148(6):845-852.

Shinoda M, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. Changes in P2X₃ receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats. *Pain* 2005;116(1-2):42-51.

Wu G, Whiteside GT, Lee G, Nolan S, Niosi M, Pearson MS, Ilyin VI. A-317491, a selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;504(1-2):45-53.

Zhang XW, Liu Q, Thorlacius H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(3):270-275.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-110.

2. Discussão

O presente estudo demonstrou que a ativação dos receptores P2X_{3,2/3} nos neurônios aferentes primários pela liberação de ATP endógeno durante inflamação no tecido periférico aumenta a susceptibilidade do neurônio aos mediadores inflamatórios finais, como as prostaglandinas E₂ e as aminas simpatomiméticas. Na verdade, os resultados desse estudo mostram que doses sublimiares de PGE₂ (4ng/pata) ou dopamina (0,4μg/pata) que não induzem hiperalgesia mecânica quando administradas sozinhas, induzem hiperalgesia mecânica da mesma magnitude de suas doses máximas quando co-administradas com o agente inflamatório carragenina ou com o agonista dos receptores P2X_{3,2/3}, αβmeATP. Embora seja descrito que o αβmeATP é agonista de receptores P2X₁, P2X₃ e P2X_{3,2/3} (Rongen et al., 1997), o envolvimento dos receptores P2X₁ parece ser improvável uma vez que pouco RNAm do receptor P2X₁ é encontrado no gânglio da raiz dorsal (Lewis et al., 1995; Collo et al., 1996) e porque foi demonstrado que IP5I, um potente e seletivo antagonista do receptor P2X₁, é ineficiente em reduzir a dor inflamatória (Honoré et al., 2002).

A administração local do antagonista seletivo dos receptores P2X_{3,2/3}, A-317491, no tecido periférico completamente preveniu a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. Foi demonstrado que a carragenina induz a liberação de IL-1β (Ferreira et al., 1988, Oliveira et al., 2009), que por sua vez, induz a liberação de prostaglandinas (Ferreira et al., 1988). No entanto, nosso estudo anterior demonstrou que a administração local de A-317491 não afeta a liberação de IL-1β no tecido periférico onde foi administrada carragenina (Oliviera et al.,

2009). Dessa maneira, esses dados sugerem que a liberação de prostaglandinas não é diminuída pelo A-317491. Uma vez que é aceito que as prostaglandinas diretamente sensibilizam os neurônios aferentes primários, a completa inibição da hiperalgesia induzida pela carragenina pelo A-317491 não pode ser explicada pela diminuição nos níveis de prostaglandina.

Baseado nesses dados, uma série de experimentos foi feita para analisar a hipótese de que a ativação dos receptores P2X3 participa da hiperalgesia mediada por mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas, que sensibilizam diretamente os nociceptores. Nossos dados demonstraram que a ativação dos receptores P2X3 aumenta a susceptibilidade dos neurônios aferentes primários à hiperalgesia induzida por PGE₂ ou dopamina. Esse estado de “priming” do neurônio parece ser essencial para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória no tecido periférico. Na verdade, os resultados desse presente estudo demonstraram que a dose de PGE₂ ou dopamina que não induzem hiperalgesia quando administradas sozinhas, induzem hiperalgesia no estado de “priming” dos neurônios na mesma magnitude das doses máximas desses mediadores quando administrados sozinhos.

É importante ressaltar que a rápida sensibilização dos neurônios aferentes primários pelo $\alpha\beta$ meATP não está associada com o aumento da susceptibilidade dos neurônios aos mediadores inflamatórios. Como descrito no “Resultados” do artigo, para evitar a liberação de mediadores inflamatórios endógenos pela carragenina ou pelo $\alpha\beta$ meATP, os ratos foram pré-tratados com dexametasona, que completamente preveniu a hiperalgesia prevenida pela carragenina ou pelo $\alpha\beta$ meATP, mas não preveniu o “priming”. Assim, nossos resultados sugerem que

a dexametasona bloqueia a liberação dos mediadores inflamatórios, mas não afeta a liberação de ATP. Além disso, nossos resultados mostraram que $\alpha\beta$ meATP induz hiperalgesia após 1 hora somente depois de sua administração e o “priming” hiperalgésico foi testado 3 horas depois de sua administração.

Foi demonstrado que a hiperalgesia induzida pela carragenina é mediada pela somatória das hiperalgesias parciais induzidas pela liberação de prostaglandinas e de aminas simpatomiméticas, uma vez que o inibidor da síntese de COX-2, indometacina, ou antagonistas β -adrenérgicos reduzem a hiperalgesia induzida pela carragenina em cerca de 50% (Cunha et al., 1991; Cunha et al., 1992). No entanto, um recente estudo demonstrou que o antagonista dos receptores P2X₃, 2/3 bloqueou completamente a hiperalgesia induzida pela carragenina, sugerindo que a ativação do receptor P2X₃,2/3 pelo ATP endógeno é essencial no desenvolvimento da sensibilização dos neurônios aferentes primários induzida pelas prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (Oliveira et al., 2009).

Foi descrito que os receptores P2X₃,2/3 são expressos predominantemente nas fibras aferentes primárias (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995). A administração intratecal de ODN antisense contra os receptores P2X₃ reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Oliveira et al, 2009). Como a ativação dos receptores P2X₃,2/3 na medula espinhal também contribui para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, nesse estudo, ODN antisense contra os receptores P2X₃ foi administrado no gânglio da raiz dorsal L5. Nossos dados demonstraram que ODN antisense contra o receptor P2X₃ preveniu a hiperalgesia induzida pelas doses sublimiares de PGE₂ ou dopamina nas patas de ratos com o “priming” da carragenina.

Foi demonstrado também que o “priming” hiperalgésico agudo depende da ativação da PKC ϵ . Além disso, a hiperalgesia induzida pela PGE₂ administrada no tecido subcutâneo também depende da PKC ϵ , que é ativada tardiamente, pelo menos 180 minutos depois da administração da PGE₂ (Sachs et AL., 2009). Baseado nisso, nesse estudo, o peptídeo PKC ϵ _{V1-2} que inibe reversivelmente a translocação da PKC ϵ (Gray et al., 1997) foi localmente administrado no tecido subcutâneo 45 minutos antes da PGE₂, mas co-administrada com carragenina. Embora a dose de 1 μ g do inibidor de PKC ϵ localmente administrado no tecido subcutâneo não tenha alterado a hiperalgesia induzida pela dose sub-máxima de PGE₂ (100 ng) em patas normais (Sachs et al., 2009), ela inibiu a hiperalgesia induzida pela dose sub-limiar de PGE₂ em patas com o “priming”. Esse dado sugere que o envolvimento da PKC ϵ nesse “priming” hiperalgésico está associado com uma via de sinalização diferente daquela envolvida na hiperalgesia induzida pela PGE₂.

Em resumo, os dados desse presente estudo demonstraram que a ativação dos receptores P2X_{3,2/3} neuronais é essencial para a hiperalgesia mecânica induzida pela liberação endógena de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas. Esses resultados sugerem que, durante um processo inflamatório no tecido periférico, nem as prostaglandinas nem as aminas simpatomiméticas, embora sensibilizem diretamente os neurônios aferentes primários, é capaz de sensibilizá-los somente por elas próprias, sendo necessária a ativação prévia da PKC ϵ .

3. Referências bibliográficas

Aguggia, M. Neurophysiology of pain. Neurol Sci, v.24 Suppl 2, May, p.S57-60. 2003.

Almeida, A. P., B. M. Bayer, *et al.* Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. J Pharmacol Exp Ther, v.214, n.1, Jul, p.74-9. 1980.

Appleton, I., A. Tomlinson, *et al.* Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. Adv Pharmacol, v.35, p.27-78. 1996.

Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, Abdel'al S, Natt F, Hall J, Winter J, Bevan S, Wishart W, Fox A, Ganju P. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. J Neurosci 2002;22(18):8139-8147.

Cao, G., S. Kuriyama, *et al.* Complete regression of established murine hepatocellular carcinoma by in vivo tumor necrosis factor alpha gene transfer. Gastroenterology, v.112, n.2, Feb, p.501-10. 1997.

Caterina, M. J. e D. Julius. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. Annu Rev Neurosci, v.24, p.487-517. 2001.

Chahl, L. A. e A. Iggo. The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous afferent nerve activity. Br J Pharmacol, v.59, n.2, Feb, p.343-7. 1977.

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. Nature 1995;377(6548):428-431.

Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford AP. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. J Physiol 2005;567(Pt 2):621-639.

Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. J Neurosci 1996;16(8):2495-2507.

Cronstein, B. N. e G. Weissmann. The adhesion molecules of inflammation. Arthritis Rheum, v.36, n.2, Feb, p.147-57. 1993.

Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. Br J Pharmacol 1991;104(3):765-767.

Cunha, F. Q., S. Poole, *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, v.107, n.3, Nov, p.660-4. 1992.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.5, Feb 1, p.1755-60. 2005.

_____. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.5, Feb 1, p.1755-60. 2005.

Davis, A. J. e M. N. Perkins. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. Br J Pharmacol, v.113, n.1, Sep, p.63-8. 1994.

Dinareello, C. A., J. G. Cannon, *et al.* Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. J Clin Invest, v.77, n.6, Jun, p.1734-9. 1986.

Ferreira, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. Nat New Biol, v.240, n.102, Dec 13, p.200-3. 1972.

Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti, *et al.* Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. Nature, v.334, n.6184, Aug 25, p.698-700. 1988.

_____. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, v.110, n.3, Nov, p.1227-31. 1993.

Ferreira, S. H. e J. R. Vane. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. Nature, v.216, n.5118, Dec 2, p.868-73. 1967.

Gallin, E. K., S. W. Green, *et al.* Comparative effects of particulate and soluble glucan on macrophages of C3H/HeN and C3H/HeJ mice. Int J Immunopharmacol, v.14, n.2, Feb, p.173-83. 1992.

Handwerker, H. O. e K. D. Neher. Characteristics of C-fibre receptors in the cat's foot responding to stepwise increase of skin temperature ot noxious levels. Pflugers Arch, v.365, n.2-3, Sep 30, p.221-9. 1976.

Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt AT, Johnston JF, Wyatt JR, Faltynek CR, Jarvis MF, Lynch K. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. Pain 2002;99(1-2):11-19.

Honore P, Mikusa J, Bianchi B, McDonald H, Cartmell J, Faltynek C, Jarvis MF. TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain* 2002;96(1-2):99-105.

Hrubey, P. S., A. K. Harvey, *et al.* Effects of anti-arthritic drugs on IL-1 induced inflammation in rats. Agents Actions, v.34, n.1-2, Sep, p.56-9. 1991.

Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17179-17184.

Julius, D. e A. I. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

Kayser, V. e G. Guilbaud. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. Pain, v.28, n.1, Jan, p.99-107. 1987.

Kennedy C, Assis TS, Currie AJ, Rowan EG. Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics. *J Physiol* 2003;553(Pt 3):683-694.

Komhoff, M., H. J. Grone, *et al.* Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. Am J Physiol, v.272, n.4 Pt 2, Apr, p.F460-8. 1997.

Lewin, G. R., Y. Lu, *et al.* A plethora of painful molecules. Curr Opin Neurobiol, v.14, n.4, Aug, p.443-9. 2004.

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995;377(6548):432-435.

Lorenzetti, B. B., F. H. Veiga, *et al.* Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. Eur Cytokine Netw, v.13, n.4, Oct-Dec, p.456-61. 2002.

Majerus, P. W. Prostaglandins: critical roles in pregnancy and colon cancer. Curr Biol, v.8, n.3, Jan 29, p.R87-9. 1998.

McGaraughty S, Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, McDonald HA, Bianchi B, Faltynek CR, Jarvis MF. Endogenous opioid mechanisms partially mediate

P2X3/P2X2/3-related antinociception in rat models of inflammatory and chemogenic pain but not neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2005;146(2):180-188.

McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee CH, Faltynek CR, Jarvis MF. Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 2003;140(8):1381-1388.

Nakamura, M. e S. H. Ferreira. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*, v.135, n.2, Mar 17, p.145-53. 1987.

Neill, K. M., K. T. Rice, *et al.* Comparison of two methods of measuring gastric pH. *Heart Lung*, v.22, n.4, Jul-Aug, p.349-55. 1993.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X3,2/3 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain* 2009;141(1-2):127-134.

Osborne, M. G. e T. J. Coderre. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, v.126, n.8, Apr, p.1840-6. 1999.

Perkins, M. N., D. Kelly, *et al.* Bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, v.73, n.7, Jul, p.832-6. 1995.

Perl, E. R., T. Kumazawa, *et al.* Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res*, v.43, p.263-77. 1976.

Pinheiro, R. M. e J. B. Calixto. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm Res*, v.51, n.12, Dec, p.603-10. 2002.

Poole, S., B. B. Lorenzetti, *et al.* Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, v.126, n.3, Feb, p.649-56. 1999.

Raja, S. N. e J. A. Haythornthwaite. Anesthetic management of the elderly: measuring function beyond the immediate perioperative horizon. *Anesthesiology*, v.91, n.4, Oct, p.909-11. 1999.

Riedel, W. e G. Neeck. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*, v.60, n.6, Dec, p.404-15. 2001.

Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond)* 1997;92(1):13-24.

Rote, N. S., E. Vogt, *et al.* The role of placental trophoblast in the pathophysiology of the antiphospholipid antibody syndrome. Am J Reprod Immunol, v.39, n.2, Feb, p.125-36. 1998.

Sachs D., Villarreal C., Cunha F., Parada C., Ferreira SH. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. Br J Pharmacol. 2009 Mar;156(5):826-34. Epub 2009 Feb 13

Safieh-Garabedian, B., S. Poole, *et al.* Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, v.115, n.7, Aug, p.1265-75. 1995.

Schaible, H. G. e R. F. Schmidt. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. J Neurophysiol, v.60, n.6, Dec, p.2180-95. 1988.

Sharp CJ, Reeve AJ, Collins SD, Martindale JC, Summerfield SG, Sargent BS, Bate ST, Chessell IP. Investigation into the role of P2X(3)/P2X(2/3) receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study. Br J Pharmacol 2006;148(6):845-852.

Sherwood, E. R. e T. Toliver-Kinsky. Mechanisms of the inflammatory response. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, v.18, n.3, Sep, p.385-405. 2004.

Snider, W. D. e S. B. McMahon. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. Neuron, v.20, n.4, Apr, p.629-32. 1998.

Vinegar, R., J. F. Truax, *et al.* Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. Fed Proc, v.46, n.1, Jan, p.118-26. 1987.

Watkins, L. R., L. E. Goehler, *et al.* Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. Brain Res, v.692, n.1-2, Sep 18, p.244-50. 1995.

Watkins, L. R., E. P. Wiertelak, *et al.* Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. Brain Res, v.654, n.1, Aug 15, p.15-26. 1994.

Woolf, C. J., A. Allchorne, *et al.* Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. Br J Pharmacol, v.121, n.3, Jun, p.417-24. 1997.

Wu G, Whiteside GT, Lee G, Nolan S, Niosi M, Pearson MS, Ilyin VI. A-317491, a selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats. Eur J Pharmacol 2004;504(1-2):45-53.

Zhang, Y., A. Shaffer, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. J Pharmacol Exp Ther, v.283, n.3, Dec, p.1069-75. 1997.