

MARCUS VINICIUS PONTE DE SOUZA FILHO

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DA HIPERNOCICEPÇÃO PELO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO: PARTICIPAÇÃO DA VIA L-ARGININA-NO-GMP_c-CANALIS K⁺_{ATP}.

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2011

S715i Souza Filho, Marcus Vinicius Ponte de
Inibição da migração de neutrófilos e da hipernocicepção
pelo pré-condicionamento isquêmico remoto : participação da
via L-ARGININA-NO-GMPc-CANAIS K^+_{ATP} / Marcus
Vinicius Ponte de Souza Filho. – Fortaleza, 2011.
108 f. : Il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce, 2011

1. Infiltração de Neutrófilos 2. Precondicionamento
Isquêmico 3. Inflamação 4. Medição da Dor 5. Óxido Nítrico
6. Analgesia I. Ribeiro, Ronaldo de Albuquerque (orient.) II.
Título

CDD: 616.0473

MARCUS VINICIUS PONTE DE SOUZA FILHO

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DA HIPERNOCICEPÇÃO PELO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO: PARTICIPAÇÃO DA VIA L-ARGININA-NO-GMP_c-CANALIS K⁺_{ATP}.

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em 20/04/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Josenilia Maria Alves Gomes
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo - USP

A meu pai, Marcus Vinicius Ponte de Souza,
por ter estado sempre a meu lado, desde criança,
me ajudando a resolver problemas e desafios
e a minha mãe, Norma Loiola Ponte de Souza,
pelo seu incessante desempenho e árdua tarefa
de ensinar e educar os filhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos EDUARDO e ANNABEL que cresceram durante a realização deste trabalho e que em seus primeiros anos de vida tiveram que dividir a atenção de seu pai com aulas, experimentos, pesquisas, análises estatísticas, projetos, relatórios e elaboração da Tese.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, pela sólida união familiar que formamos, o que nos faz ajudar uns aos outros nas mais diversas situações, nos fazendo crer que nunca estamos sozinhos.

À Mayara por me dar um grande apoio no momento final de elaboração desta Tese, me estimulando a fazer sempre o melhor e me mostrando que as coisas acontecem quando são para acontecer.

Ao Professor Doutor RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, orientador deste trabalho, por ter me apoiado desde o início de minha formação, procurando sempre me estimular a achar as respostas para os inúmeros questionamentos que surgem quando se pretende enveredar no mundo da ciência; e acima de tudo pelo exemplo como mestre, pesquisador, amigo e irmão.

Ao Professor Doutor FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, por ter me acolhido em Ribeirão Preto desde o início de minha formação, me estimulando em cada uma das fases de minha vida, e, especificamente neste trabalho, por me co-orientar nos experimentos de migração de neutrófilos.

À Professora Doutora MARIANA LIMA VALE, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por me co-orientar nos experimentos de dor, e por seus importantes comentários e sugestões durante o exame de qualificação.

Ao Professor Doutor MARCELLUS HENRIQUE LOIOLA PONTE DE SOUZA, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e sugestões durante a realização dos experimentos.

Ao Professor Doutor ARMÊNIO AGUIAR DOS SANTOS, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos e questionamentos sempre gerados, e por ter participado do exame de qualificação.

Ao Professor Doutor ANTÔNIO ALDO MELO FILHO, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por ter participado ativamente do exame de qualificação e por seus importantes comentários e sugestões.

Ao Professor Doutor, PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por sua dedicação à formação de Mestres e Doutores em Cirurgia.

Ao Professor Doutor, JOSE HUYGENS PARENTE GARCIA, Chefe do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo estímulo constante ao crescimento da pós-graduação em cirurgia em nossa instituição.

Ao amigo e colega de pós-graduação FELIPE SIMÃO, pela ajuda durante a fase inicial do trabalho e pela continuidade do mesmo em Ribeirão Preto.

Aos estudantes de Medicina BRUNO RIBEIRO e NATÁLIA MONTEIRO, pela participação durante toda a fase experimental do estudo e ajuda na interpretação dos resultados.

Aos colegas de pós-graduação ANTONIELA e PEDRO MARCOS, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela ajuda durante o desenvolvimento e análise dos dados nos experimentos.

A todos os colegas da pós-graduação do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e sugestões prestadas durante todo o desenvolvimento deste trabalho

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), e a todos os seus professores, pós-graduandos e estudantes, que depois de anos de ausência me acolheu como se sempre estivesse presente, demonstrando um espírito de estímulo constante naqueles que constituem a família LAFICA.

A todos os colegas do Laboratório de Inflamação e Dor de Ribeirão Preto, especialmente SÍLVIO MANFREDO VIEIRA, THIAGO MATTAR CUNHA, ANDRESSA DE FREITAS, FABIOLA LESLIE ANTUNES CARDOSO MESTRINER e DANIELA DAL SECCO, pelo acolhimento nos momentos de bancadas e pelo apoio descontraído durante minha estadia em Ribeirão Preto.

A HENRIQUE DE PAULA LEMOS, do Laboratório de Inflamação e Dor de Ribeirão Preto, pela ajuda durante o desenvolvimento e análise dos dados nos experimentos de migração de neutrófilos.

À VANDA FRANÇA PINHEIRO, técnica do LAFICA, pela presteza e seriedade profissional demonstradas no ambiente de trabalho.

À Senhora MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA, Secretária do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, uma excelente profissional, sempre prestativa e eficaz, uma verdadeira amiga de todos os pós-graduandos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro oferecido.

“Aquilo que não me mata,
só me fortalece”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DA HIPERNOCICEPÇÃO PELO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO: PARTICIPAÇÃO DA VIA L-ARGININA-NO-GMPc-CANAIIS K^+_{ATP} . MARCUS VINICIUS PONTE DE SOUZA FILHO. Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Doutor em Cirurgia). ABRIL, 2011. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

A lesão de reperfusão (LR) ocorre quando há retardo do restabelecimento do fluxo sanguíneo para órgãos e tecidos. Dentre as estratégias propostas para atenuar a LR está o pré-condicionamento isquêmico (PCI), que consiste na indução de curtos períodos de isquemia seguidos de reperfusão realizados antes da isquemia prolongada. Na primeira parte deste trabalho, o objetivo do estudo foi avaliar a participação do Óxido Nítrico (NO), guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e canais de potássio sensíveis a ATP (K^+_{ATP}) no efeito inibitório do PCI da pata posterior na migração de neutrófilos (MN) para cavidade peritoneal de camundongos. Na segunda parte, o objetivo foi avaliar o potencial antinociceptivo sistêmico do PCI no teste de hipernocicepção plantar mecânica (HPM; Von Frey) em ratos, bem como avaliar o envolvimento do NO, GMPc e canais K^+_{ATP} neste evento. Na primeira parte, o PCI foi induzido através da isquemia da pata posterior direita por 10 min seguidos de 30 min de reperfusão em camundongos selvagens e com deleção gênica da NO sintase induzível (NOSi -/-). O rolamento de leucócitos (RL), adesão de leucócitos (AL), bem como a MN foram induzidos através da administração ip de Carragenina (Cg, 500 μ g/cavidade), sendo os resultados expressos em número de leucócitos/min, número de células aderidas/100 μ m², e número de neutrófilos x 10⁶/cavidade, respectivamente. Diferentes grupos de animais foram tratados com salina, Aminoguanidina (AG, sc, 100mg/kg), ODQ (ip, 8 μ mol/kg) ou Glibenclamida (GBC, sc, 20mg/kg) 30 min antes da indução do PCI. Os controles receberam o mesmo tratamento, porém sem PCI. Na segunda parte, o PCI foi induzido através da isquemia da pata posterior direita de ratos machos Wistar (180-200g) por 10 min seguidos de 30 min de reperfusão. Cg (300 μ g, intraplantar) ou Prostaglandina E₂ (PGE₂ – 400 ng, intraplantar) foram utilizadas como estímulo hipernociceptivo na pata esquerda imediatamente após a indução do PCI na pata contralateral. Diferentes grupos de animais foram tratados 30 min antes da indução do PCI com AG (100mg/kg, sc), LNMMA (50 μ g, intraplantar), ODQ (8 μ g, intraplantar) ou GBC (160 μ g, intraplantar). Os controles receberam os mesmos tratamentos, porém sem PCI. A quantificação da HPM foi realizada através da subtração da força /pressão (g) necessária para provocar a retirada da pata em contato com o aparelho de von Frey eletrônico mensurada antes do estímulo hipernociceptivo, pela medida obtida 3h após a administração do estímulo. O RL, AL e MN induzidos por Cg na cavidade peritoneal foram significativamente (p<0,01) inibidos pelo PCI da pata posterior dos animais selvagens (RL= 75,94%, AL= 56,51%, MN= 79,01%), o mesmo não sendo observado nos animais NOSi -/-. O tratamento dos animais selvagens com AG e ODQ, mas não com GBC, anularam o efeito inibitório do PCI sobre a MN induzida por Cg. O tratamento dos animais com AG, ODQ ou GBC não alterou significativamente a MN induzida por Cg na cavidade peritoneal. Observou-se ainda que o PCI não alterou os níveis de TNF- α , IL1- β e quimiocina CXCL1 induzidos por Cg na cavidade peritoneal. A hipernocicepção mecânica induzida por Cg ou PGE₂ na pata posterior esquerda foi reduzida significativamente (p<0,01) quando se realizou o PCI na pata direita (55% e 68%), sendo o efeito antinociceptivo do PCI anulado quando os animais foram tratados com AG, LNMMA, ODQ ou GBC antes do PCI. O tratamento dos animais com AG, LNMMA, ODQ ou GBC não alterou significativamente a hipernocicepção induzida pelos estímulos nociceptivos. Nossos resultados demonstram que o PCI apresenta um efeito inibitório na MN a distância, sendo o NO um importante mediador envolvido neste processo, provavelmente através da via GMPc. Este efeito inibitório do PCI parece não depender da abertura de canais K^+_{ATP} , nem da inibição da síntese e/ou liberação de citocinas pro-inflamatórias. O esclarecimento do mecanismo através do qual o PCI inibe a MN poderá trazer importantes contribuições em situações clínicas onde a infiltração neutrofilica constitui um fator complicador. O PCI apresenta ainda um potente efeito inibidor na dor inflamatória, parecendo ser o NO um importante mediador envolvido neste efeito protetor do PCI, atuando através da via GMPc / canais K^+_{ATP} . Esta é a primeira demonstração descrita na literatura do efeito antinociceptivo sistêmico do PCI, sendo o esclarecimento dos mecanismos envolvidos neste processo fundamental para manuseio da dor induzida pelos mais diversos estímulos.

Descritores: Infiltração de Neutrófilos. Precondicionamento Isquêmico. Inflamação. Medição da Dor. Óxido Nítrico. Analgesia.

ABSTRACT

REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING INHIBITS NEUTROPHIL MIGRATION AND HYPERNOCICEPTION: ROLE OF NO-cGMP-K⁺ATP CHANNEL PATHWAY. MARCUS VINICIUS PONTE DE SOUZA FILHO. *Stricto Sensu* Post-Graduation, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (Surgery PhD). APRIL, 2011. Advisor: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

The reperfusion injury (RI) occurs when there is delay in restoring blood flow to organs and tissues. Among the strategies proposed to attenuate the RI is the ischemic preconditioning (IPC), which consists of induction of brief ischemic periods followed by reperfusion performed before the sustained ischemic insult. In the first part, this study aimed to evaluate the role of nitric oxide (NO), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and ATP-sensitive potassium channels (K⁺_{ATP}) in the inhibitory effect of hind limb IPC on the mice peritoneal cavity neutrophil migration (NM). In the second part, the objective was to evaluate the potential systemic antinociceptive effect of IPC in mechanical plantar hypernociception test (MPH; Von Frey) in rats and to evaluate the involvement of NO, cGMP and K⁺_{ATP} channels in this event. In the first part, the IPC was induced by hind limb ischemia for 10 min followed by 30 min of reperfusion in wild and knockout mice to inducible NO synthase (iNOS -/-). The leukocyte rolling (LR), leukocyte adhesion (LA) and NM were induced by ip administration of Carrageenan (Cg, 500 µg/cavity) and results expressed in number of leukocytes/min, number of adherent leukocytes/100 µm² cells and number of neutrophils x 10⁶/cavity, respectively. Different groups of animals were treated with saline (SAL), Aminoguanidine (AG, sc, 100mg/kg), ODQ (ip, 8 µmol/kg) or Glibenclamide (GBC, sc, 20 mg/kg) 30 min before IPC induction. Controls received the same treatment, but without IPC. In the second part, the IPC was induced by hind limb ischemia for 10 min followed by 30 min of reperfusion in male Wistar rats (180-200g). Cg (300 µg, intraplantar) or Prostaglandin E₂ (PGE₂ - 400 ng, intraplantar) were used as hypernociceptive stimulus on left paw immediately after induction of IPC in contralateral paw. Different groups of animals were treated 30 min before induction of IPC with AG (100 µg/kg, intraplantar), LNMMA (50 µg, intraplantar), ODQ (8 µg, intraplantar) or GBC (160 µg, intraplantar). Controls received the same treatments, but without IPC. The quantification of MPH was performed through subtraction strength/pressure (g) required to cause withdrawal of paw in contact with an apparatus of electronic von Frey mensuared before hypernociceptive stimulus, by measure obtained 3h after administration of Cg or PGE₂. The LR, LA and NM induced by Cg in the peritoneal cavity were significantly (p < 0,01) inhibited by hind limb IPC of wild animals (LR= 75.94%, LA= 56.51%, NM= 79.01 %), but these effects were not observed in animals iNOS -/-. The treatment of wild animals with AG and ODQ, but not with GBC, abrogated the inhibitory effect of IPC on NM induced by Cg. Treatment of animals with AG, GBC or ODQ did not significantly alter the NM induced by Cg in the peritoneal cavity. We also observed that IPC did not alter the TNF-α, IL1-β and CXCL1 chemokine levels induced by Cg in the peritoneal cavity. The mechanical hypernociception induced by Cg or PGE₂ in left hind paw was significantly reduced (p < 0,01) when IPC was performed in the right paw (55% and 68%). The treatment of animals with AG, LNMMA, ODQ or GBC, before IPC, abrogated the antinociceptive effect of IPC. Treatment of animals with AG, LNMMA, ODQ or GBC did not significantly alter the hypernociception induced by noxious stimulation. Our results show that IPC has an inhibitory effect on remote NM, with NO an important mediator involved in this process, probably through the cGMP pathway. This inhibitory effect of IPC does not depend on the opening of K⁺_{ATP} channels, or inhibition of synthesis and/or release of pro-inflammatory cytokines. The elucidation of the mechanism by which IPC inhibits the NM may make important contributions to clinical situations where neutrophil infiltration is a complicating factor. The IPC also has a potent inhibitory effect on inflammatory pain, with NO seems to be one important mediator involved in this protective effect of IPC, acting through the cGMP/K⁺_{ATP} channel pathway. This is the first demonstration described in the literature of systemic antinociceptive effect of IPC, and the elucidation of the mechanisms involved in this process is fundamental for pain management induced by several inflammatory stimuli.

Key-words: Neutrophil Infiltration. Ischemic Preconditioning. Inflammation. Pain Measurement. Nitric Oxide. Analgesia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Migração de neutrófilos para o sítio inflamatório em resposta a estímulo quimiotático.....	32
FIGURA 2 -	Síntese enzimática endógena do óxido nítrico (NO).....	37
FIGURA 3 -	Aplicação do torniquete com faixa elástica.....	54
FIGURA 4 -	Aplicação de azul de Evans através do plexo venoso dorsal do pênis.....	54
FIGURA 5 -	Distribuição do azul de Evans por todo o corpo do animal, exceto pela pata isquêmica.....	55
FIGURA 6 -	Comparação das patas posteriores após 10 minutos de isquemia.....	55
FIGURA 7 -	Delineamento experimental do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico na migração de neutrófilos e na hipernocicepção....	57
FIGURA 8 -	Modelo de Microscopia Intravital.....	59
FIGURA 9 -	Hipernocicepção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata.....	61
FIGURA 10 -	Aferição da hipernocicepção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata.....	61
FIGURA 11 -	Avaliação do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em camundongos selvagens.....	62
FIGURA 12 -	Avaliação do efeito do Pré-condicionamento isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em camundongos NOSi-/-.....	66
FIGURA 13 -	Avaliação do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior direita na hipernocicepção mecânica da pata posterior esquerda.....	67
FIGURA 14 -	Extração de Azul de Evans nas patas posteriores direita e esquerda durante o Pré-condicionamento Isquêmico em camundongos.....	72
FIGURA 15 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	73

FIGURA 16 -	Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	74
FIGURA 17 -	Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	75
FIGURA 18 -	Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	76
FIGURA 19 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o rolamento leucocitário induzido por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-.....	77
FIGURA 20 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a adesão leucocitária ao endotélio vascular induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-.....	78
FIGURA 21 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-.....	79
FIGURA 22 -	Fotomicrografia representativa do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-.....	80
FIGURA 23 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens	81
FIGURA 24 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos.....	82
FIGURA 25 -	Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	83

FIGURA 26 –	Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	84
FIGURA 27 –	Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	85
FIGURA 28 –	Papel dos canais de K ⁺ _{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos...	86
FIGURA 29 –	Esquema ilustrativo do mecanismo hipotético proposto para o efeito do Pré-condicionamento isquêmico remoto na inibição da migração de neutrófilos.....	93
FIGURA 30 –	Esquema ilustrativo do mecanismo hipotético proposto para o efeito antinociceptivo do Pré-condicionamento isquêmico remoto.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Canais K^+_{ATP} : Canais de potássio sensíveis a ATP
Canais mK^+_{ATP} : Canais de potássio sensíveis a ATP mitocondriais
Canais sK^+_{ATP} : Canais de potássio sensíveis a ATP sarcolemais
CPK: Creatinina fosfoquinase
DO: densidade óptica
EPM: erro padrão da média
GC: Guanilato ciclase
GCs: Guanilato ciclase solúvel
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
GMPc: Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
5-HD: 5-Hidroxidecanoato
IASP: Associação Internacional para Estudo da Dor
ICAM-1: Molécula de adesão endotelial intercelular tipo 1
IL: Interleucina
KC: Quimiocina CXCL1
L-NAME: L-NG-Nitroarginina metil ester
L-NMMA: NG-Mono-metil-L-Arginina
L-NA: NG-nitro-L-arginina
L-NNA: N-omeganitro-L-arginine
MPO: Mieloperoxidase
NDGA: Ácido nordihidroguaiarético
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
NOSe: Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi: Óxido nítrico sintase induzível
NOSi^{-/-}: com depleção gênica da NOSi
NOSn: Óxido nítrico sintase neuronal
ODQ: 1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one
PBS: Tampão salina-fosfato
PCI: Pré-condicionamento isquêmico

PCI-r: Pré-condicionamento isquêmico remoto

PGE₂: Prostaglandina E₂

SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina

TNF: Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Pré-condicionamento isquêmico.....	21
1.2 Vias envolvidas no pré-condicionamento isquêmico remoto.....	28
1.3 Participação do pré-condicionamento isquêmico remoto no processo inflamatório.....	30
1.4 Recrutamento de neutrófilos.....	31
1.5 Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos.....	33
1.6 Participação da via L-Arginina-NO-GMPc no recrutamento de neutrófilos.....	36
1.7 Dor inflamatória.....	39
1.8 Mecanismos envolvidos na dor inflamatória.....	42
1.9 Participação da via L-Arginina-NO-GMPc na dor inflamatória.....	46
2 OBJETIVOS	50
3 MÉTODO	51
3.1 Animais.....	51
3.2 Drogas.....	52
3.3 Preparo de Soluções e Corantes.....	52
3.4 Modelos Experimentais.....	53

3.4.1 Indução do Pré-condicionamento Isquêmico na pata posterior de rato..	53
3.4.2 Indução do Pré-condicionamento Isquêmico na pata posterior de camundongos.....	56
3.4.3 Migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	57
3.4.4 Microscopia Intravital.....	58
3.4.5 Quantificação de TNF- α , IL-1 β e KC.....	59
3.4.6 Hipernocicepção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).....	60
3.5 Protocolos Experimentais.....	62
3.5.1 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	63
3.5.2 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	63
3.5.3 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	64
3.5.4 Papel dos canais de K ⁺ _{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	64
3.5.5 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal.....	65
3.5.6 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o	

rolamento, adesão leucocitária ao endotélio venular e migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos por carragenina em camundongos selvagens e NOSi-/-.....	65
3.5.7 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos.....	68
3.5.8 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	68
3.5.9 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	68
3.5.10 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	69
3.5.11 Papel dos canais de K ⁺ _{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	70
3.6 Análise estatística.....	71
4 RESULTADOS	72
4.1 Protocolo de Pré-condicionamento Isquêmico em camundongos.....	72
4.2 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	73
4.3 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata	

posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	74
4.4 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	75
4.5 Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos.....	76
4.6 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o rolamento, adesão leucocitária ao endotélio venular e migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos por carragenina em camundongos selvagens e NOSi-/-.....	77
4.7 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal.....	80
4.8 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos.....	82
4.9 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	82
4.10 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	83
4.11 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata	

posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	84
4.12 Papel dos canais de K ⁺ _{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE ₂ na pata contralateral de ratos.....	85
5 DISCUSSÃO.....	87
6 CONCLUSÕES.....	89
7 REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS.....	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pré-condicionamento isquêmico

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) foi descoberto em 1986 como um mecanismo protetor endógeno contra a isquemia (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986). O PCI exerce um efeito anti-infarto muito potente, e acredita-se que o conhecimento e a manipulação dos mecanismos que ocorrem neste fenômeno possam levar ao desenvolvimento de uma terapia anti-infarto eficaz (COHEN; BAINES; DOWNEY, 2000).

O PCI foi descrito pela primeira vez por Murry, Jennings e Reimer (1986). Cães anestesiados foram submetidos a quatro períodos de 5 minutos seqüenciais de isquemia miocárdica regional, cada um seguido de 5 minutos de reperfusão, antes de um desafio isquêmico sustentado de 40 minutos. Paradoxalmente foi verificado que os breves períodos de isquemia, os quais foram breves demais para causar necrose, reduziram de forma importante o infarto gerado durante a oclusão sustentada subsequente, dos esperados 30% da região afetada para somente 7%. A proteção não foi relacionada a alterações no fluxo colateral e persistia mesmo com o aumento do período de isquemia sustentada. Esta foi a primeira intervenção, depois da revascularização, que limitou de forma inequívoca o infarto do miocárdio e conseqüentemente vem sendo objeto de importante interesse clínico e científico.

O efeito protetor do PCI sobre a lesão de isquemia-reperfusão miocárdica foi demonstrado em todas as outras espécies testadas, incluindo ratos (LIU; DOWNEY, 1992), coelhos (LIU et al., 1991), porcos (VAHLHAUS et al., 1996) e camundongos (SMITH et al., 2002). Por questões éticas não é possível testar diretamente se o PCI é eficaz em corações humanos. Entretanto, Speechly-Dick, Grover e Yellon (1995) demonstraram, em modelo *in vitro* de isquemia de células atriais humanas, que períodos prévios de pré-condicionamento hipóxico foram capazes de melhorar a recuperação funcional das células atriais humanas *in vitro* submetidas a um período extenso de hipóxia. Diversas abordagens têm sido descritas para tentar demonstrar o efeito do PCI no coração humano intacto, entretando os resultados são conflitantes e controversos, além de muitas vezes apresentarem limitações metodológicas.

Antelmi et al. (1996) relatam uma melhor evolução clínica no grupo de pacientes que apresentaram angina antes do infarto do miocárdio quando

comparado ao grupo de pacientes sem angina prévia, podendo este fato ser explicado, pelo menos em parte, pelo fenômeno de PCI, uma vez que a incidência de circulação colateral nos dois grupos foi semelhante.

Outra evidência clínica do PCI foi descrita por Maybaum et al. (1996) que demonstraram que testes repetitivos de exercícios foram capazes de melhorar os parâmetros isquêmicos miocárdicos induzidos por um teste de exercício subsequente.

Entretanto, Perrault et al. (1996) não conseguiram demonstrar a melhora da cardioproteção induzida pela cardioplegia com a realização do PCI através do clampeamento da aorta ascendente por 3 minutos, seguidos por 2 minutos de reperfusão, quando realizado antes do início da cardioplegia.

Ghosh e Galiñanes (2003) estudaram o efeito do PCI na proteção do tecido miocárdico lesado, em pacientes submetidos à realização de ponte de artéria coronária com ou sem ponte cardiopulmonar, e verificaram que o PCI induzido antes do procedimento com um ciclo de 5 minutos de isquemia seguido por 5 minutos de reperfusão foi protetor nos pacientes que realizaram o procedimento sem ponte cardiopulmonar. Entretanto não ofereceu benefício adicional quando associado à ponte, uma vez que a ponte cardiopulmonar por si induz pré-condicionamento.

A proteção proporcionada pelo PCI sobre a lesão isquêmica prolongada foi demonstrada em outros órgãos e sistemas, como cérebro, retina, fígado, pulmão, rim, pâncreas, intestino, estômago e musculatura esquelética (FRASSETTO et al., 1999; ZHANG et al., 2002; RÜDIGER et al., 2002; SONCUL; OZ; KALAYCIOGLU, 1999; TORRAS et al., 2002; DEMBINSKI et al., 2003; UNAL et al., 2003; PAJDO et al., 2001; SAITO et al., 2004).

Frassetto et al. (1999), utilizando um modelo de isquemia cerebral em ratos, relataram que o PCI com 2 minutos foi capaz de diminuir de forma significativa o estresse oxidativo periférico induzido por uma isquemia cerebral global de 10 minutos. Masada et al. (2001) observaram que o PCI com a oclusão temporária da artéria cerebral média por 15 minutos foi capaz de atenuar significativamente o edema e o infarto cerebral, o déficit neurológico e a ruptura da barreira hematoencefálica que ocorreram 24 horas após a oclusão permanente da artéria cerebral média de ratos.

Zhang et al. (2002) demonstraram que o PCI reduz a lesão isquêmica das células da retina em modelo de isquemia retiniana em ratos com o aumento da

pressão intraocular acima da pressão arterial sistólica, sendo este efeito, pelo menos em parte, devido à atenuação da morte celular por apoptose.

Rüdiger et al. (2002) induziram PCI em fígado de camundongos com 10 minutos de isquemia seguidos de 15 minutos de reperfusão antes da realização de uma isquemia hepática prolongada de 75 minutos, observando uma melhora significativa dos parâmetros de lesão hepática.

Em modelo de pulmão isolado de cobaias, Soncul, Oz e Kalaycioglu (1999) observaram um efeito protetor do PCI, induzido por dois ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusão, na lesão de isquemia-reperfusão pulmonar 30 minutos após uma isquemia de 3 horas.

Torras et al. (2002) utilizando diversos protocolos de PCI renal observaram que um ciclo de 15 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusão foi o mais eficaz em promover tanto proteção funcional quanto histológica sobre a lesão de reperfusão induzida por 40 minutos de clameamento dos pedículos renais de ratos.

No pâncreas o efeito do PCI foi testado no modelo de pancreatite induzida por isquemia-reperfusão. Dembinski et al. (2003) relataram uma diminuição dos níveis plasmáticos de lípase e Interleucina (IL) 1 beta, bem como dos sinais histológicos de lesão pancreática nos ratos submetidos a PCI, com 2 períodos de 5 minutos de clameamento da artéria celíaca com intervalo de 5 minutos, antes da indução da pancreatite com clameamento de 30 minutos da artéria esplênica seguidos por 1 hora de reperfusão.

Unal et al. (2003) demonstraram que a lesão de reperfusão intestinal que ocorre após 40 minutos de oclusão da artéria mesentérica superior seguida de 60 minutos de reperfusão é significativamente atenuada com a realização prévia de 2 ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusão. Nesta situação, os valores de mieloperoxidase e malondialdeído encontram-se significativamente diminuídos, bem como as alterações histológicas de lesão de mucosa e o número de células apoptóticas na mucosa intestinal dos ratos.

Em estômagos, a oclusão da artéria celíaca por 5 minutos (1-5 episódios) com 30 minutos de reperfusão foi capaz de atenuar significativamente as lesões gástricas que ocorriam após 30 minutos de isquemia e 3 horas de reperfusão (PAJDO et al., 2001).

Para demonstrar o efeito protetor do PCI na musculatura esquelética Saito et al. (2004) avaliaram os níveis de mieloperoxidase no músculo gastrocnêmico bem como a oxigenação tecidual por espectroscopia com luz próxima ao infravermelho após teste de exercício, e observaram uma melhora significativa das alterações induzidas pelo clampeamento infra-renal da aorta abdominal quando os ratos eram submetidos a PCI.

Na prática clínica o PCI está sendo objeto de estudo em diversas áreas, principalmente naquelas situações onde é obrigatório o estabelecimento de um período isquêmico como no caso de transplante de órgãos e tecidos (KOSIERADZKI, 2002), bem como nos casos onde o estabelecimento de um período isquêmico pode aumentar a eficácia de um procedimento. Assim, Clavien et al. (2003) realizaram um estudo prospectivo randomizado com 100 pacientes submetidos à ressecção hepática alargada (maior que uma bissegmentectomia) com ou sem PCI e observaram que os níveis séricos das transaminases foram significativamente menores nos pacientes submetidos a PCI com 10 minutos de isquemia hepática seguidos de 10 minutos de reperfusão realizado antes da oclusão do fluxo hepático para realização das ressecções hepáticas.

O PCI apresenta tanto um efeito protetor precoce quanto tardio, cuja importância de cada um deles varia de acordo com a espécie e órgão estudado (NAPOLI; PINTO; CIRINO, 2000).

Em geral o PCI precoce ocorre imediatamente e é mais potente que o tardio. Esse se inicia 24 horas após a isquemia, é mais duradouro e depende da síntese de novas substâncias (COHEN; BAINES; DOWNEY, 2000). Vários mediadores envolvidos no efeito protetor do PCI precoce também estão presentes no PCI tardio e, embora o exato mecanismo dos dois componentes ainda não esteja claro, o PCI pode ser definido como um processo fisiopatológico multifatorial, necessitando da interação de numerosos mecanismos de sinalização celular, segundo mensageiros e efetor final (NAPOLI; PINTO; CIRINO, 2000).

Os principais iniciadores propostos para o fenômeno de PCI são adenosina, opióides, bradicinina e radicais livres, os quais juntos produzem estímulo suficiente para ativar a proteína quinase C e iniciar a complexa cascata das quinases, o que pode eventualmente levar a abertura dos canais mitocondriais de potássio sensíveis a ATP (K^+_{ATP}) (COHEN; BAINES; DOWNEY, 2000). Este poderia ser considerado o efetor final do processo de PCI, uma vez que o influxo aumentado

de potássio dissiparia o potencial de membrana sendo benéfico durante a isquemia, pois poderia prevenir o desperdício de ATP por hidrólise (GARLID et al., 1997) ou diminuir o gradiente elétrico na mitocôndria que favorece o influxo de cálcio (HOLMUHAMEDOV; WANG; TERZIC, 1999). Entretanto vários pontos ainda não são conhecidos e vários outros mecanismos têm sido propostos, demonstrando a complexidade deste poderoso fenômeno protetor.

Dentre os outros mecanismos propostos para explicar o efeito protetor do PCI está o aumento de expressão e síntese de citocinas e mediadores inflamatórios ou inibição de células envolvidas no processo inflamatório (SMITH et al., 2002; HARKIN et al., 2002; BOLLI, 2001; ALCINDOR et al., 2004; KIMURA et al., 1998).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF)-alfa é um dos principais mediadores implicados no desenvolvimento da tolerância a isquemia induzida pelo PCI, entretanto também é descrito como uma das principais substâncias envolvidas na lesão celular local e sistêmica após um período prolongado de isquemia. Smith et al. (2002) demonstraram que a produção de TNF-alfa é necessária para cardioproteção induzida pelo PCI em camundongos, uma vez que este fenômeno não é observado nos animais com deleção gênica do TNF-alfa. Entretanto Belosjorow et al. (2003), em modelo experimental de isquemia miocárdica em coelhos, observaram que o pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-TNF-alfa foi tão eficaz quanto o PCI na redução do tamanho do infarto. Em modelos de cultura de neurônios, Ginis et al. (2002) estudaram o efeito do pré-condicionamento induzido por TNF-alfa, o qual foi eficaz na proteção tanto dos neurônios em cultura contra a morte isquêmica, como dos astrócitos em cultura contra os efeitos proinflamatórios do próprio mediador, mostrando que ele pode modular seu próprio efeito.

A ação protetora do PCI também foi relacionada à diminuição dos níveis de IL-6 após isquemia dos membros posteriores de porco por 2 horas (HARKIN et al., 2002), à diminuição de IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa após isquemia de 30 minutos em coração de ratos (HIASA et al., 2001), à redução da liberação de IL-1 beta no modelo de pancreatite induzida por lesão de isquemia-reperfusão em ratos (DEMBINSKI et al., 2003), bem como ao aumento da geração de IL-10 com conseqüente diminuição da liberação de IL-1 beta após lesão de perfusão hepática em ratos (SERAFÍN et al., 2004).

Outra substância envolvida em processos inflamatórios diversos que parece ocupar um local importante na fisiopatologia do fenômeno de PCI é o Óxido

nítrico (NO) (BOLLI, 2001). Zhang et al. (2004) demonstraram um aumento significativo da expressão do gene para a óxido nítrico sintase induzível (NOSi) após o PCI de retalho de músculo grácil de ratos, entretanto Aksöyek et al. (2002), em modelo de isquemia intestinal em ratos, verificou que o PCI era capaz de prevenir o aumento de expressão da NOSi que ocorria após oclusão prolongada de 30 minutos da artéria mesentérica superior. O bloqueio da síntese de NO foi capaz de eliminar os benefícios do PCI em modelos experimentais de lesão de isquemia-reperfusão hepática (SERAFÍN et al., 2004) e renal (TORRAS et al., 2002) em ratos, bem como em coração isolado de cobaias (NOVALIJA et al., 2003). Assim como o TNF-alfa, o NO parece também ser capaz de modular seu efeito durante o PCI, uma vez que estudos *in vitro* com cultura de neurônios sugerem que o NO produzido na isquemia é fundamentalmente tóxico, entretanto o NO é crítico para o desenvolvimento do PCI neuronal (KAWAHARA et al., 2004).

Os metabólitos do ácido aracdônico, outros importantes mediadores inflamatórios, estão descritos como envolvidos no mecanismo do PCI. Murphy et al. (1995), em modelo de coração isolado de rato, verificaram que o inibidor da lipoxigenase, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), mas não o inibidor da cicloxigenase indometacina, foi capaz de inibir de forma significativa o efeito protetor do PCI, bem como o aumento do cálcio livre citossólico durante a isquemia prolongada. Entretanto estudos recentes mostraram que celecoxib, um inibidor seletivo da cicloxigenase tipo 2, aboliu o efeito do PCI sobre a diminuição da área de infarto em cães submetidos a 60 minutos de oclusão coronariana e 3 horas de reperfusão (ALCINDOR et al., 2004).

A ativação do sistema complemento pode estar envolvida num dos passos do mecanismo do PCI, pois o bloqueio de sua ativação foi capaz de atenuar significativamente a lesão mucosa induzida pela lesão de reperfusão intestinal em ratos (KIMURA et al., 1998).

Recentemente várias evidências apontam para a possibilidade do PCI apresentar uma ação sistêmica, além de seu clássico efeito local sobre o órgão preconditionado (PERALTA et al., 2002; TAMION et al., 2002; HARKIN et al., 2002; LI et al., 2001; DICKSON et al., 2002).

Peralta et al. (2002) observaram que a lesão de reperfusão hepática em ratos induzia lesão pulmonar com acúmulo de neutrófilos, produção de radicais livres e distúrbios da microcirculação, os quais eram reduzidos de forma significativa

quando os animais eram submetidos a PCI hepático antes da indução da isquemia prolongada.

Afora os seus efeitos protetores nas lesões consequentes à isquemia e isquemia-reperfusão, o PCI parece funcionar como um mecanismo protetor em lesões de caráter inflamatório. Tamion et al. (2002), por exemplo, em modelo de choque hemorrágico em ratos, verificaram que o PCI intestinal com 4 ciclos de 1 minuto de isquemia e 10 minutos de reperfusão reduziu a necessidade de fluidos para a ressuscitação, o edema pulmonar e a produção de TNF-alfa que ocorriam após a indução do choque hemorrágico.

Utilizando modelo de isquemia de membros posteriores de porco, Harkin et al. (2002) promoveram uma significativa diminuição do edema pulmonar, infiltração neutrofílica e alterações de troca de gases relacionadas à isquemia prolongada dos membros posteriores quando os animais foram preconditionados.

Li et al. (2001) verificaram que, em pacientes submetidos à troca de valva cardíaca, o PCI, com 2 ciclos de 3 minutos de clampeamento aórtico e 2 minutos de reperfusão antes da parada cardíaca induzida, atenua a infiltração pulmonar de leucócitos polimorfonucleares, aumenta a tensão arterial de oxigênio e índice cardíaco, bem como histologicamente melhora a lesão pulmonar, quando comparada com os controles.

Dickson et al. (2002) demonstraram que o concentrado do efluente de coração de coelhos preconditionados foi capaz de induzir tolerância isquêmica em jejuno isolado submetido a 60 minutos de isquemia simulada, e Wang et al. (2000) produziram cardioproteção à isquemia através do PCI intestinal de ratos em modelo experimental *in vivo*. Kharbanda et al. (2002) produziram uma diminuição na extensão do infarto do miocárdio experimental com a realização de PCI nos membros posteriores de porco. Küntscher et al. (2002a) demonstraram que a indução de PCI com 10 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão na pata posterior de ratos foi capaz de induzir, no retalho muscular de cremaster contralateral submetido à isquemia de 2 horas, uma melhora significativa na microcirculação, com aumento da velocidade de células vermelhas nas arteríolas de primeira ordem e capilares, um fluxo capilar maior, e um menor número de leucócitos aderindo ao endotélio das vênulas pós-capilares. Esta nova forma de PCI realizado num sítio distante do local do evento avaliado foi denominada de PCI remoto (PCI-r).

1.2 Vias envolvidas no pré-condicionamento isquêmico remoto

O PCI-r é um novo método onde a isquemia seguida de reperfusão de um órgão é capaz de proteger órgãos distantes, tanto devido à liberação de mensageiros bioquímicos na circulação quanto à ativação de vias neurais, resultando na liberação de mensageiros que possuem efeitos protetores. Isto protege o tecido alvo sem qualquer estresse direto. O PCI-r foi demonstrado pela primeira vez no miocárdio por McClanahan et al. (1993) que evidenciaram que a isquemia renal seguida de reperfusão protegia o miocárdio da isquemia e reduzia a área de infarto. Em modelos animais, pequenos períodos de isquemia seguidos de reperfusão do membro, intestino ou rins reduziram o tamanho do infarto do miocárdio. Em humanos, o PCI-r esquelético foi utilizado para proteção miocárdica, com seu efeito benéfico atribuído a regulação da proteção endotelial (KHARBANDA et al., 2002).

Adenosina, NO, TNF-alfa, opióides, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), ciclooxigenase, canais K^+ _{ATP}, capsaicina, proteínas do choque térmico e norepinefrina estão todos envolvidos no mecanismo do PCI-r. Estas substâncias são liberadas como uma resposta ao estresse, atuando por via neuronal ou humoral para proporcionar a proteção do órgão à distância. As vias envolvidas são diferentes em resposta a diferentes estímulos isquêmicos e geralmente se conectam uma com a outra (TAPURIA et al., 2008).

Semelhante ao que ocorre no PCI direto, o PCI-r apresenta um efeito protetor tanto precoce quanto tardio, com comprovações tanto em modelos animais como recentemente em estudos em humanos (PELL et al., 1998; SCHOEMAKER & HEIJNINGEN, 2000; WOLFRUM et al., 2002; WANG et al., 2001; OXMAN et al., 1997; CHEUNG et al., 2006). A primeira aplicação clínica em humanos do PCI-r foi através de um ensaio clínico randomizado onde se verificou que a indução do PCI-r com quatro ciclos de 5 minutos de isquemia e reperfusão do membro inferior foi capaz de diminuir o nível de troponina e a resistência pulmonar em crianças submetidas a reparo cirúrgico de defeitos cardíacos congênitos (CHEUNG et al., 2006).

O possível envolvimento da via neurogênica na transdução do efeito do PCI-r foi sugerido por alguns autores (OXMAN et al., 1997; LOUKOGEORGAKIS et

al., 2005; BIRNBAUM et al., 1997). Em modelo animal, Oxman et al. (1997) mostraram um aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas com o PCI-r na pata posterior, o qual foi abolido com o bloqueio nervoso autonômico com reserpina. Loukogeorgakis et al. (2005) mostraram a participação do sistema nervoso autônomo na transdução do sinal protetor do PCI-r, entretanto foram incapazes de definir o componente específico do sistema nervoso autônomo envolvido. Birnbaum et al. (1997) demonstraram uma redução da área de infarto do miocárdio com a indução de PCI-r através da redução parcial do suprimento sanguíneo para a pata combinado com uma rápida estimulação elétrica do músculo gastrocnêmico de coelho.

Em contraste, diversos estudos tem demonstrado um aumento nos níveis séricos de nitratos, opióides, radicais livres, e catecolaminas com a indução do PCI-r, dando suporte à via humoral (WANG et al., 2001; OXMAN et al., 1997; WEINBRENNER et al., 2004; ADDISON et al., 2003; CHEN XG et al., 2005; CHEN YS et al., 2005; KANORIA et al., 2006). No estudo de Weinbrenner et al. (2004), o efeito protetor foi observado apenas nos grupos submetidos a um período de reperfusão após a isquemia em comparação com aqueles sem reperfusão após a isquemia. Ademais, a oclusão aórtica simultânea à oclusão coronariana não produziu proteção (TAKAOKA et al., 1999; WEINBRENNER et al., 2002), indicando que o pré-condicionamento deveria ser realizado em um momento anterior para que permitisse que a substância liberada atingisse o coração. Estes resultados demonstraram a libertação de substâncias protetoras na circulação sanguínea. O bloqueio nervoso autonômico com hexametônio não aboliu o efeito protetor do PCI-r (CHEN XG et al., 2005). Estudos demonstrando a presença do efeito cardioprotetor do PCI-r no modelo de transplante cardíaco em ratos (coração denervado) sugeriram a participação de fatores hematogênicos no PCI-r (KRISTIANSEN et al., 2005; KONSTANTINOV et al., 2005b).

Estes estudos não são claros em demonstrar ser a via neurogênica ativada localmente nos leitos mesentérico, renal ou esquelético, ou ser ativada pela liberação de mediadores presentes na circulação (via humoral) com subsequente estimulação de fibras aferentes sensitivas. A necessidade de reperfusão para o estabelecimento do efeito protetor do PCI-r e o aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas, adenosina, neuropeptídeos, citocinas, radicais livres ou nitrito sugerem que estas substâncias podem ativar vias neurogênicas após suas

liberações na circulação sanguínea. Parece que tanto a via neurogênica quanto a humoral possuem elementos em comum que se sobrepõem e não são mutuamente exclusivas (TAPURIA et al., 2008).

1.3 Participação do pré-condicionamento isquêmico remoto no processo inflamatório

O efeito do PCI na inibição do processo inflamatório induzido pela lesão de isquemia-reperfusão é bem conhecido, entretanto o efeito do PCI-r em outros modelos de inflamação aguda foi somente relatado recentemente (SOUZA FILHO, 2005; SOUZA FILHO et al., 2009, 2010).

Neste contexto, a indução do PCI-r na pata posterior de ratos foi capaz de inibir a resposta inflamatória induzida por carragenina na pata contralateral. No modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, o PCI-r na pata inibiu significativamente tanto o edema vesical quanto o aumento da permeabilidade vascular induzida por ifosfamida. O PCI-r na pata posterior também apresentou um efeito protetor na lesão gástrica induzida por antiinflamatórios não esteroidais, inibindo tanto a extensão da lesão gástrica quanto a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica induzidos por indometacina (SOUZA FILHO et al., 2009).

O mecanismo através do qual o PCI-r é capaz de inibir esta resposta inflamatória não foi ainda esclarecido. Por apresentarem um papel central em todos estes modelos inflamatórios, os neutrófilos podem representar elementos fundamentais na elucidação deste mecanismo.

Alguns estudos corroboram esta observação. Kharbanda et al. (2001) demonstraram que o PCI-r em membros superiores reduziu a ativação de neutrófilos humanos e de complexos plaquetas-neutrófilos induzidos pela isquemia-reperfusão do membro. Em modelo semelhante de isquemia do antebraço em humanos, Konstantinov et al. (2004) mostraram uma redução na expressão de genes proinflamatórios em leucócitos circulantes após a indução do PCI-r. Em outro estudo, o PCI-r no membro modificou a expressão de genes no miocárdio tanto na fase precoce quanto na tardia. Após o PCI-r, vários genes proinflamatórios (Egr-1 e Dusp 1 e 6, por exemplo) foram suprimidos e genes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo e na citoproteção foram restaurados no miocárdio (KONSTANTINOV et al, 2005a).

Durante a fase aguda da resposta inflamatória, além do calor e rubor, a interação do tecido danificado com os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos leva ao desenvolvimento concomitante de um denominador comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor. Apesar dos inúmeros estudos com PCI e aos recentes relatos de Souza Filho (2009, 2010), até onde podemos constatar, não existe na literatura mundial nenhum trabalho científico avaliando o efeito do PCI remoto na dor inflamatória.

1.4 Recrutamento de neutrófilos

Frequentemente o organismo é exposto a agentes infecciosos como bactérias, vírus e fungos. Na maioria das vezes os patógenos são rapidamente contidos pelos mecanismos de defesa inatos do organismo, o que evita o desenvolvimento de doenças infecciosas (JANEWAY, 2001). Dentre esses mecanismos de defesa encontram-se as barreiras físicas, e a ativação da resposta inflamatória (BORREGAARD; COWLAND, 1997; MALECH; GALLIN, 1987).

As superfícies epiteliais do organismo representam uma proteção mecânica contra a maioria dos patógenos. Frequentemente, mesmo quando essa barreira é rompida os microrganismos são eficientemente combatidos e removidos. Isso é possível graças ao reconhecimento dos agentes infecciosos através de receptores de superfície encontrados em componentes do sistema imune inato, como os fagócitos mononucleares (macrófagos) residentes no tecido. A ativação desses receptores desencadeia uma resposta inflamatória local, com consequente vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo local de proteínas plasmáticas (componentes do complemento e fatores da coagulação), bem como produção de inúmeros mediadores inflamatórios e recrutamento de leucócitos. Destas alterações, a mobilização adequada e em tempo hábil dos leucócitos da microcirculação para o sítio inflamatório constitui-se em estratégia fundamental de defesa do organismo contra as infecções (MALECH; GALLIN, 1987). No entanto, é importante ressaltar que a migração de leucócitos e a lesão tissular que a acompanha são deletérias ao organismo quando essas ocorrem na ausência de focos infecciosos, ou quando não são adequadamente controladas na presença de infecções (WEISS, 1989; WEISSMANN; KORCHAK, 1984).

Nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, causados por microrganismos ou de origem não infecciosa, as células predominantes e que são primeiramente recrutadas ao sítio inflamatório são os neutrófilos. A migração desses leucócitos durante a resposta inflamatória resulta principalmente da liberação, por células residentes, de fatores quimiotáticos. Dentre estes fatores, destacam-se: mediadores lipídicos, como o fator de agregação plaquetária e o leucotrieno B₄ (LTB₄); fragmentos do complemento, como o C5a; citocinas, como interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α); e quimiocinas, incluindo CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GRO- α), CXCL12 (SDF-1), CXCL1 (KC), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CXCL2 (MIP-2) (BINDER; KRESS; KIRSCHFINK, 1999; DRISCOLL et al., 1995; DROST; MACNEE, 2002; LEE et al., 2000; MULDER; COLDITZ, 1993; VON STEBUT et al., 2003; YAN et al., 1998). A liberação destes mediadores resulta em aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, promovendo a migração celular a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (HUTTENLOCHER; SANDBORG; HORWITZ, 1995; WAGNER; ROTH, 1999) (Figura 1).

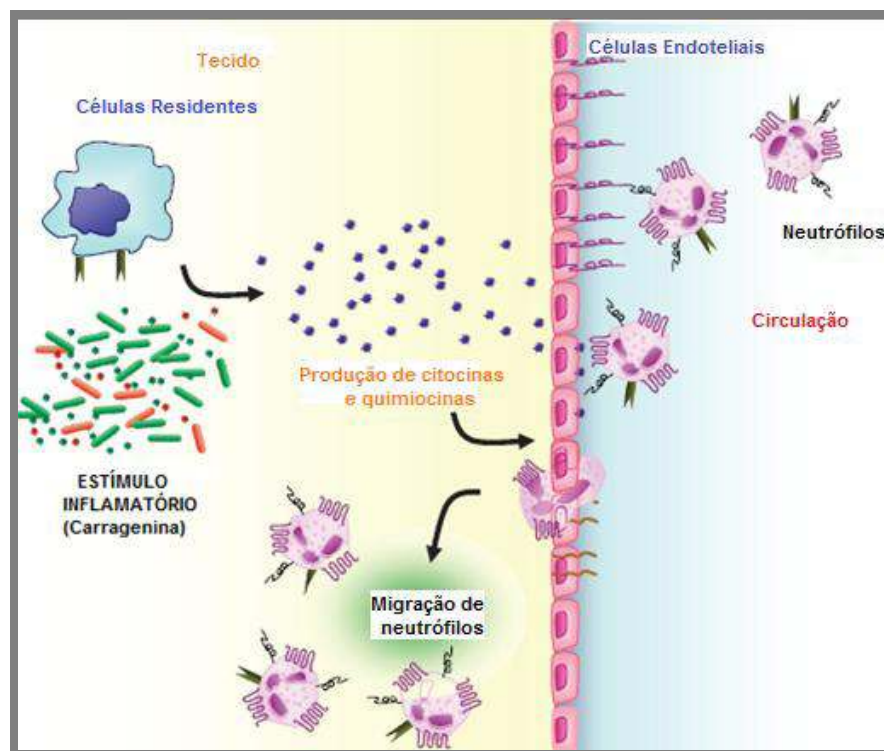


FIGURA 1 - Migração de neutrófilos para o sítio inflamatório em resposta a estímulo quimiotático.

Fonte: Adaptado de ALVES-FILHO et al., 2008.

1.5 Mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos

O processo de recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório pode ser dividido didaticamente em quatro etapas: marginação, rolamento, adesão firme e transmigração.

Tanto o processo conhecido como marginação, representado pela mobilização dos leucócitos ao longo da superfície endotelial dos vasos sanguíneos, quanto o rolamento desses sobre o endotélio, caracterizam os primeiros passos para o recrutamento de neutrófilos e são mediados por uma família de glicoproteínas de adesão denominadas selectinas (L-, P- e E-selectinas) (VESTWEBER; BLANKS, 1999; WATSON et al., 1990). Essas moléculas são encontradas tanto nos leucócitos (L-selectina) quanto no endotélio (P- e E-selectinas), e são assim denominadas por possuírem similaridades em seu domínio N-terminal extracelular com as lectinas de mamíferos.

Uma das etapas iniciais da adesão firme, e conseqüente interrupção do rolamento leucocitário, é o aumento da afinidade da ligação das moléculas integrinas, presentes nos leucócitos, com seus respectivos receptores. Assim, as β_2 -integrinas leucocitárias interagem com as moléculas da superfamília das imunoglobulinas presentes nas células endoteliais, ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50), iniciando a adesão. Além disso, a β_1 -integrina liga-se à molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1 ou CD106), também pertencente à superfamília das imunoglobulinas (BARTHEL et al., 2008; ISSEKUTZ; ROWTER; SPRINGER, 1999; SMITH, 1993).

Após a adesão firme inicia-se o passo final do recrutamento neutrofílico, no qual essas células ultrapassam a parede endotelial. Esta etapa também envolve as integrinas leucocitárias CD18CD11a (LFA-1) e CD18CD11b (MAC-1), bem como a molécula pertencente à família das imunoglobulinas PECAM-1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* ou CD31). Essa última é expressa na maioria dos leucócitos e está presente em altas concentrações na superfície das células endoteliais, interagindo com a integrina $\alpha V\beta_3$, bem como com ela própria na membrana plasmática leucocitária (NEWMAN, 1997; SMITH, 1993, 2008).

Após a passagem dos neutrófilos através da membrana basal, estes se dirigem ao foco da inflamação por um processo denominado quimiotaxia, o qual corresponde à locomoção orientada do neutrófilo ao longo de um gradiente químico.

Várias substâncias como o PAF, LTB₄, C5a, citocinas e quimiocinas podem atuar como quimioatraentes.

Tanto o PAF quanto o LTB₄ são derivados da cascata do ácido araquidônico e atuam aumentando a aderência leucocitária no endotélio venular. Enquanto o primeiro pode ser produzido por células endoteliais, plaquetas, monócitos e neutrófilos, o segundo é sintetizado principalmente por monócitos e neutrófilos (NOHGAWA et al., 1997).

A clivagem do quinto componente do sistema complemento, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, leva à produção do C5a, o qual exerce inúmeras atividades sobre os neutrófilos, incluindo desgranulação, aumento da respiração oxidativa celular, alterações no citoesqueleto, além de potente ação quimiotática (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

O TNF- α e a IL-1 β não são considerados fatores quimiotáticos clássicos, uma vez que não induzem migração *in vitro*. Contudo, essas citocinas promovem a síntese e/ou liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, por células residentes, como os macrófagos (FACCIOLI et al., 1990). Além disso, induzem o processo de migração de neutrófilos por promoverem aumento na expressão de moléculas de adesão (DANGERFIELD; WANG; NOURSHARGH, 2005; TESSIER et al., 1998; YANG et al., 2005).

As quimiocinas são peptídeos com peso molecular entre 6 e 15 kD, contendo cerca de 60 a 80 aminoácidos, pertencentes a uma família de citocinas quimioatraentes cuja atividade é mediada através da sua ligação a receptores transmembrana acoplados à proteína G (MURDOCH; FINN, 2000; PREMACK; SCHALL, 1996). As quimiocinas compartilham seqüências homólogas entre si e podem ser divididas em 4 classes principais (C-C, C-X-C, C-X₃-C e C), dependendo da orientação do resíduo de cisteína na seqüência de aminoácidos da cadeia peptídica. Assim, as duas primeiras cisteínas podem apresentar-se adjacente ligadas (C-C ou α), separadas por um aminoácido (C-X-C ou β), ou separadas por três aminoácidos (C-X₃-C); ainda, a quimiocina pode apresentar apenas um resíduo de cisteína (C ou γ). Dentre as classes de quimiocinas que ativam e induzem predominantemente a migração de neutrófilos estão as C-X-C: CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1), CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) (AHUJA; MURPHY, 1996; FIGARELLA-BRANGER et al., 2003; LAING; SECOMBES, 2004; ROLLINS, 1997). Uma característica interessante das quimiocinas é que estas podem ligar-se ao

complexo glicosaminoglicano-heparina e heparan sulfato, presentes na matriz extracelular, formando um gradiente de concentração associado à matriz ao longo do qual os neutrófilos podem migrar até o foco da inflamação (LUSTER, 1998; TESSIER et al., 1998).

Uma vez presentes no sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos. A destruição dos microrganismos é realizada principalmente por mecanismos dependentes de oxigênio. Os neutrófilos possuem um sistema enzimático oxidativo, acoplado à membrana plasmática, conhecido como NADPH-oxidase, o qual é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo, também denominado de *explosão respiratória*. Neste sistema, ocorre transferência de elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido (O_2^-), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e, este, a radicais hidroxilas. Todos esses compostos são denominados genericamente de intermediários reativos (ou espécies reativas) de oxigênio (BELLAVITE, 1988; MALECH; GALLIN, 1987). Em geral, a quantidade de peróxido de hidrogênio formado no processo acima descrito, não é capaz de induzir destruição eficaz dos microrganismos. No entanto, os grânulos azurófilos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO) que, na presença de íons cloreto (Cl^-), converte o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso. Esse último representa importante agente oxidante capaz de destruir o microrganismo injuriante (KLEBANOFF, 1970).

Outra substância altamente reativa utilizada por neutrófilos para exercer sua função microbicida é o NO. Neutrófilos ativados expressam a enzima NOSi, que leva à produção de NO. Uma vez formado, o NO pode interagir com espécies reativas de oxigênio, formando múltiplos metabólitos antimicrobianos, como o peroxinitrito, os S-nitrosotiois e o dióxido de nitrogênio (MATHEIS et al., 1992; MULLIGAN et al., 1991).

Os neutrófilos também podem destruir os microrganismos por mecanismos independentes de oxigênio e nitrogênio, por meio da ação de substâncias presentes em seus grânulos citoplasmáticos, tais como defensinas, lisozimas, elastases, catepsinas, hidrolases ácidas localizadas nos grânulos azurófilos e por colagenases e lactoferrinas presentes nos grânulos secundários ou específicos (LEHRER et al., 1988).

Apesar do recrutamento de neutrófilos durante o processo infeccioso ser crucial para o controle deste evento, a ocorrência de uma resposta inflamatória exacerbada gera efeitos deletérios e indesejáveis. Uma vez que os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que contribuem para a lesão tecidual e conseqüente disfunção de órgãos, torna-se fundamental haver, concomitantemente à liberação de mediadores pró-inflamatórios, liberação de mediadores que atuem regulando este evento.

1.6 Participação da via L-Arginina-NO-GMPc no recrutamento de neutrófilos

O NO é uma molécula gasosa que se difunde facilmente através das membranas plasmáticas e que possui meia-vida da ordem de segundos. É sintetizado a partir do oxigênio molecular e do nitrogênio guanidino da L-arginina em uma reação catalisada por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) (Figura 2). Existem três isoformas da NOS, a neuronal (NOS_n ou NOS-1), endotelial (NOS_e ou NOS-3) e a induzível (NOS_i ou NOS-2) (BREDT; GLATT et al., 1991). A NOS_e está presente nas células endoteliais vasculares e, a NOS_n, no citosol de neurônios centrais e periféricos, bem como em sítios extraneuronais como o músculo esquelético, pâncreas e rins (BREDT; GLATT et al., 1991; BREDT; HWANG et al., 1991; MICHEL; LI; BUSCONI, 1993). A ativação da NOS_e e NOS_n é cálcio-dependente, e estas são isoformas constitutivamente expressas, envolvidas na modulação de vários processos fisiológicos, como vasodilatação e neurotransmissão (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A isoforma induzível é considerada “cálcio-independente” e tem sua transcrição ativada por citocinas como o TNF- α , a IL-1 β , o interferon (IFN)- α , - β , - γ e endotoxinas liberadas durante o processo inflamatório ou infeccioso como o LPS (CUNHA et al., 1994; WOLKOW, 1998).

O real envolvimento do NO, produzido pelas diferentes isoformas de NOS ou exogenamente administrado, no processo de migração celular ainda apresenta muita controvérsia na literatura. De fato, há evidências sugerindo tanto ações anti quanto pró-inflamatórias, bem como dados negativos referentes à modulação da migração leucocitária são encontrados.

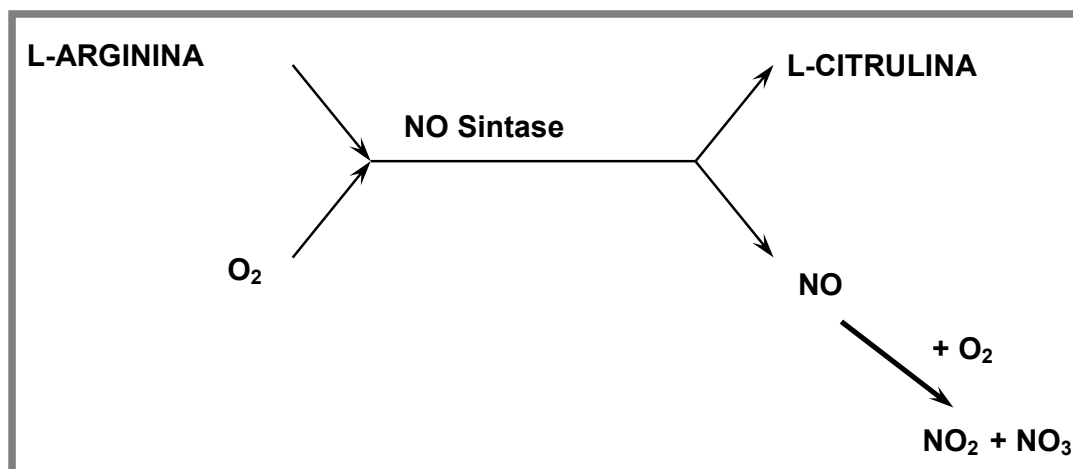


FIGURA 2 - Síntese enzimática endógena do óxido nítrico (NO).

Os estudos que sugerem ações antiinflamatórias apontam, dentre outros, como principais mecanismos envolvidos: (i) bloqueio da ligação de fatores de transcrição nuclear ao DNA; (ii) diminuição da biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio; (iii) formação de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (AHLUWALIA et al., 2004; DAL SECCO et al., 2003; FUKAHORI et al., 1994; HICKEY; KUBES, 1997; IALENTI et al., 2000; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; MATHEIS et al., 1992; MULLIGAN et al., 1991; NIU; IBBOTSON; KUBES, 1996). Nesse sentido, o NO parece bloquear a ligação do fator de transcrição nuclear NF- κ B ao DNA celular, impedindo a síntese da quimiocina CXCL8 (IL-8), comprometendo dessa forma a quimiotaxia. (FOWLER et al., 1999). Ainda, a inibição da síntese de NO aumenta os níveis de O_2^- e a formação de outros oxidantes, sugerindo que na ausência desse mediador a produção do ânion O_2^- estaria elevada (GABOURY et al., 1993; GUIDOT et al., 1995; RODENAS; MITJAVILA; CARBONELL, 1998). Outra importante relação entre níveis de NO e de O_2^- diz respeito ao sistema enzimático responsável pela síntese desse radical livre, o qual possui um grupo heme prostético ao qual o NO pode se ligar, inibindo a geração dessa espécie reativa de oxigênio (FUKAHORI et al., 1994). A diminuição da biodisponibilidade de O_2^- , causada pelo NO, pode comprometer a migração leucocitária por impedir que este sofra dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). De fato, tem sido demonstrado que o H_2O_2 induz adesão através da geração de PAF e pelo aumento da expressão de outras moléculas chaves envolvidas nesse

processo (NIU; IBBOTSON; KUBES, 1996). É importante ressaltar que, níveis elevados de O_2^- são capazes de ativar o NF- κ B, aumentando a produção de citocinas e quimiocinas (SEN; PACKER, 1996; SUK; YEOU KIM; KIM, 2001), bem como de estimular os mastócitos a liberarem agentes pró-adesivos como citocinas (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1986; JOHNSTON; KANWAR; KUBES, 1996; NIU; IBBOTSON; KUBES, 1996).

Outras evidências que apontam o NO como importante modulador antiinflamatório estão relacionadas à ativação do segundo mensageiro GMPc. Deste modo, foi demonstrado que o NO diminui a expressão de P-selectina induzida por IL-1 β , *in vitro*, por meio da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e pela formação de GMPc (AHLUWALIA et al., 2004). Alguns autores observaram que o GMPc também está envolvido com a redução da expressão da glicoproteína IIb/IIIa, outra importante molécula de adesão (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987; SALAS et al., 1998).

Ações pró-inflamatórias são sugeridas em estudos realizados com camundongos tratados com inibidores seletivos da NOSi (L-NIL ou aminoguanidina) ou inibidores não seletivos da NOS (L-NMMA ou L-NAME), bem como com camundongos depletados de NOSi (NOSi $^{-/-}$). Todos esses estudos observaram uma redução da migração neutrofílica ao sítio inflamatório (AJUEBOR et al., 1998; CUZZOCREA et al., 2000; FRANCO-PENTEADO et al., 2001; MCCARTNEY-FRANCIS et al., 2001).

O papel do NO na inibição da migração de neutrófilos que ocorre durante a sepsis, e também após a administração sistêmica de LPS, foi demonstrado através do pré-tratamento dos animais com o inibidor seletivo da NOSi aminoguanidina (ALVES-FILHO et al., 2008; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; TAVARES-MURTA et al., 2001). Benjamim, Ferreira e Cunha (2000) demonstraram que durante o choque endotóxico induzido por ligadura e punção do ceco ocorria uma inibição significativa da migração de neutrófilos com mortalidade de 100% dos animais, entretanto quando os animais eram pré-tratados com aminoguanidina, nas doses de 10 e 30 mg/kg, a migração de neutrófilos era revertida com taxa de sobrevivência dos animais de 60% e 80%, respectivamente. Tavares-Murta et al. (2001) demonstraram que o pré-tratamento dos animais com aminoguanidina aboliu a inibição da migração de neutrófilos induzida pela administração sistêmica de LPS, bem como o aumento

dos níveis séricos de nitrito, sem alterar os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Isto sugeria que o NO seria o mediador final envolvido na inibição neutrofílica.

Por fim, vários estudos falharam em demonstrar efeitos anti ou pró-inflamatórios do NO. Assim, nenhuma alteração significativa no número de neutrófilos infiltrados nos sítios inflamatórios foi observada em experimentos realizados com animais tratados com agentes inibidores da síntese ou doadores de NO (COCKRELL et al., 1999; FOX-ROBICHAUD; PAYNE; KUBES, 1999; KUBES; SIHOTA; HICKEY, 1997; TSUKADA et al., 1999).

Devido as controvérsias da literatura tanto no que se refere ao papel do NO no PCI-r quanto aos mecanismos pelos quais o NO inibe a migração de neutrófilos, no presente trabalho foi proposto investigar a participação do NO no efeito inibitório do PCI-r na migração de neutrófilos.

1.7 Dor inflamatória

Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. Portanto, além de envolver a percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais especializados (nociceptores) são ativados (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999), a dor apresenta um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção e aprendizagem (LOESER; MELZACK, 1999). Recentemente, Ferreira e colaboradores vêm trabalhando com uma forma mais simplificada dessa definição, considerando a dor a **“percepção desagradável de uma sensação nociceptiva”** (CUNHA, 2008). Este conceito também envolve dois componentes da dor, a nocicepção e a sua percepção. A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiências de vida de cada pessoa. A partir dessas considerações, dor seria o termo mais adequado quando se refere ao ser humano, enquanto nocicepção seria mais indicado para animais experimentais, uma vez que não se entende a percepção nos mesmos (NOBACK et al., 1996).

Os estímulos nocivos (ou nociceptivos), físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (bradicinina, capsaicina, serotonina, prótons etc.), são detectados por

nociceptores presentes nos diferentes tecidos. Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas, de uma família específica de neurônios sensoriais primários. O termo nociceptor também é comumente utilizado para definir o neurônio nociceptivo primário como um todo, não apenas as suas terminações nervosas livres. Os nociceptores são neurônios pseudo-unipolares, possuindo um ramo axonal distal, que se dirige à periferia, e outro ramo axonal proximal, que se dirige ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral. Eles inervam amplamente pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras (revisado por BESSON; CHAOUCH, 1987; MILLAN, 2002; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Baseado em critérios morfológicos, as fibras nociceptivas podem ser classificadas em fibras de pequeno e médio diâmetro. As fibras de médio diâmetro, também denominadas fibras A δ , são finamente mielinizadas e possuem velocidades de condução entre 2 e 30 m/s. Elas correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras de pequeno diâmetro, também denominadas fibras C, não são mielinizadas e por isso possuem velocidade de condução baixa (0,5 - 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa (revisado por MILLAN, 1999; JULIUS E BASBAUM, 2001). Elas correspondem a 80% das fibras condutoras da informação nociceptiva. Também existem diferenças quanto ao tipo de estímulo nociceptivo capaz de ativar essas fibras. Enquanto as fibras A δ respondem, principalmente, a estímulos mecânicos e térmicos, as fibras C são ditas polimodais e respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (revisado por JULIUS E BASBAUM, 2001). As fibras C também têm sido implicadas na transmissão de estímulos responsáveis pelo prurido (JOHANEK et al., 2008).

Dentro do grupo de fibras C, há uma população de neurônios que apresentam alto limiar de ativação, que, em situações normais, não respondem a estímulos térmicos ou mecânicos. No entanto, durante um processo inflamatório esses neurônios passam a ser mais facilmente ativáveis, tornando-se responsivos tanto a estímulos mecânicos quanto térmicos. Eles foram denominados “nociceptores dormentes ou silenciosos” (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; revisado por MCMAHON e KOLTZENBURG, 1990). Convém ressaltar que, durante processos patológicos (eg. neuropatias) nos quais ocorre uma plasticidade neuronal

central, as fibras A β , de largo diâmetro e altamente mielinizadas, responsáveis pela detecção de estímulos inócuos (eg. táteis), podem passar a responder como nociceptores. Nestas condições, estímulos táteis inócuos, detectados por estas fibras, são interpretados como nociceptivos, dando origem ao fenômeno de alodinia.

Uma resposta inflamatória aguda é iniciada após a lesão tecidual, bem como após o reconhecimento, pelo sistema imunológico, de um agente estranho ao organismo ou de estruturas próprias como sendo não-próprias. Entre os primeiros sinais de um processo inflamatório estão o rubor e o calor. Estes sinais inflamatórios podem ser considerados uma tentativa do tecido de facilitar a remoção do agente agressor, como toxinas e bactérias, aumentando a área para migração das células de defesa para o local da lesão. Durante a fase aguda, devido à formação do edema inflamatório (tumor), ocorre também o aumento da drenagem linfática, que facilita o trânsito de células imunológicas essenciais para a defesa do organismo. Em acréscimo a esses eventos, há o desenvolvimento concomitante de um denominador comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor.

Alterações plásticas nos neurônios que transmitem a nocicepção são responsáveis pelas modificações nas sensações dolorosas observadas durante o processo inflamatório (revisado por MILLAN, 1999). A plasticidade neuronal pode ocorrer tanto em nível periférico quanto central. Ela é importante no aparecimento de dois fenômenos da dor inflamatória: a hiperalgesia e a alodinia. HARDY et al. (1950) definiram hiperalgesia como “um estado de intensificação da sensação dolorosa mediante uma estimulação nociva”, enquanto alodinia é definida pela IASP como “a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso”. Enquanto o aparecimento do fenômeno de hiperalgesia parece estar associado, principalmente, à sensibilização dos nociceptores (sensibilização periférica), o processo de alodinia parece também envolver uma plasticidade neuronal no sistema nervoso central, em especial na medula espinal (revisado por WOOLF; SALTER, 2000; ZEILHOFER; ZEILHOFER, 2008). Eletrofisiologicamente, a sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (WALL & MELZACK, 1999).

É importante ressaltar que as definições de hiperalgesia e alodinia foram elaboradas para serem usadas em humanos, pois a alodinia possui uma característica fundamental que é induzir também uma mudança qualitativa na percepção da sensação esperada com base nas características do estímulo aplicado, ou seja, ocorre uma perda da especificidade da modalidade sensorial (eg. estímulos táteis causam dor). Assim, alodinia é uma característica principalmente das neuropatias, as quais se caracterizam por lesões neuronais, fazendo com que estímulos de pouca intensidade e pequena duração passem a causar dores lancinantes ou sensações de queimação contínua. Contudo, esta característica de alteração da percepção não pode ser avaliada nos modelos experimentais usuais de nocicepção animal, embora o uso impróprio deste termo tenha se generalizado nas descrições do modo de ação e nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças como as neuropatias. Em função disso, a diminuição do limiar nociceptivo, que ocorre durante a inflamação, será referida neste texto como hipernocicepção inflamatória ou, simplesmente, hipernocicepção, quando houver referências a experimentos de nocicepção animal, e como hiperalgesia, quando ocorrer no homem.

1.8 Mecanismos envolvidos na dor inflamatória

A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Há mediadores inflamatórios que apenas sensibilizam os nociceptores e mediadores (e estímulos) que desencadeiam a resposta nociceptiva. A dor inflamatória aguda resulta da ação de um estímulo desencadeante (mecânico, químico ou térmico) ou de um mediador, como, por exemplo, a bradicinina, que ativa esses neurônios periféricos sensibilizados. Já a hiperalgesia/hipernocicepção inflamatória é o resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos por uma ativação metabotrópica em todo neurônio sensitivo. Atualmente, quando se refere à sensibilização dos nociceptores, não se está apenas mencionando suas extremidades periféricas, mas pode-se dizer que a hiperalgesia/hipernocicepção é resultado de um fenômeno que ocorre em toda extensão do neurônio nociceptivo. Essas modificações funcionais da excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual ou pelo reconhecimento

de um elemento estranho ao organismo pelas células residentes do sistema imunológico, como os mastócitos, ou, mais especificamente, os macrófagos. Pode-se chamar os macrófagos de células “de alarme”, uma vez que estas reconhecem o “agente estranho” e desencadeiam a resposta inflamatória, ou seja, ativam uma resposta imune inata (DE SOUZA; FERREIRA, 1985).

Um ponto importante no que se refere à indução da hipernocicepção/hiperalgesia inflamatória é que a liberação dos mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Quando se realiza uma análise do exsudato inflamatório, colhido em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo, é possível detectar uma grande variedade de mediadores. Porém, se for realizada uma análise temporal cuidadosa desse exsudato, observar-se-á que a liberação dos mesmos segue uma seqüência definida. É por esta razão que, ao se bloquear um passo desta seqüência, pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor (CUNHA et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória, no que se refere à dor, podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários e os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais interagem diretamente com seus receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização (CUNHA et al., 2007).

Dentre os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais pode-se destacar as prostaglandinas, principalmente, as da série E (PGE_2), como substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores, desencadeando a hipernocicepção. A habilidade das prostaglandinas em sensibilizar diretamente os nociceptores foi observada em humanos e animais, com a utilização de técnicas eletrofisiológicas e também comportamentais (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978; MARTIN et al., 1987). Elas são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase, sendo o ácido araquidônico seu substrato. Em condições fisiológicas, o ácido araquidônico encontra-se esterificado nos fosfolípidios de membrana, sendo mobilizado durante o processo inflamatório pela fosfolipase A₂,

que é ativada por estímulos químicos, mecânicos e produtos microbianos (FERREIRA; VANE, 1967; FUNK, 2001; IVANOV & ROMANOVSKY, 2004).

Além das prostaglandinas, inúmeros estudos experimentais também demonstram a existência de um componente simpático na sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório. Foi observado que substâncias, como as aminas simpáticas (Ex: noradrenalina, adrenalina e dopamina), são capazes de induzir hipernocicepção mecânica de forma semelhante às prostaglandinas (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; KHASAR et al., 1999a). Além disso, inibidores da liberação das aminas simpáticas e antagonistas de receptores adrenérgicos reduzem parcialmente a hipernocicepção inflamatória mecânica (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 2002, PARADA et al., 2003).

Embora as prostaglandinas e as aminas simpáticas sejam as substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores mais extensivamente estudadas, outras substâncias também apresentam esta propriedade. Nesse contexto, pode-se destacar as endotelinas e os leucotrienos. (LEVINE et al., 1984; MARTIN et al., 1987; FERREIRA et al. 1989; ZHOU et al., 2002). A liberação desses mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais (prostaglandinas, aminas simpáticas e endotelinas), geralmente, é precedida pela liberação de mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários (CUNHA et al., 1992; VERRI JR et al., 2004; CUNHA et al., 2005).

Dentre os mediadores intermediários destacam-se as citocinas como os mediadores que apresentam o papel mais bem caracterizado na dor inflamatória (revisado por VERRI JR et al., 2006). Estes mediadores que, a princípio, pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, mostraram-se relevantes também na gênese da dor. As citocinas mais estudadas na hipernocicepção inflamatória são o TNF-alfa, a IL-1 e a IL-8 (revisado por VERRI JR et al., 2006). Foi demonstrado, tanto em ratos, quanto em camundongos, que estas citocinas são liberadas seqüencialmente durante o processo inflamatório e constituem uma ligação entre o estímulo inflamatório e a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção (revisado por VERRI JR et al., 2006).

Após a ativação dos receptores presentes nos nociceptores pelos mediadores inflamatórios finais (ex. prostaglandinas e aminas simpáticas), iniciam-se

os mecanismos periféricos neuronais da dor inflamatória. Esses mecanismos são representados, principalmente, por vias metabólicas de sinalização com a participação de enzimas e segundos mensageiros intracelulares, culminando na modulação da atividade de canais iônicos (COUTAUX et al., 2005). Tanto os receptores para as prostaglandinas, quanto para aminas simpáticas ($\beta 1/\beta 2$), expressos nos neurônios nociceptivos primários, fazem parte da família de receptores celulares metabotrópicos acoplados à proteína G. A expressão destes receptores está mais associada com fibras nociceptivas não-mielinizadas, ou seja, fibras C, ou mesmo, em nociceptores “dormentes”. A interação dessas substâncias com seus respectivos receptores levam à ativação de várias vias de sinalizações diferentes.

O segundo mensageiro a ser inicialmente implicado na dor inflamatória foi o adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) (FERREIRA et al., 1979a; TAIWO et al., 1989). A produção do AMPC é necessária para que ocorra uma amplificação do processo que se iniciou na membrana da célula neuronal. O aumento da concentração intracelular de AMPC regula diversas respostas biológicas por modular diretamente a atividade de uma classe de enzimas, as proteínas quinases. Na grande maioria das células, o AMPC exerce seus efeitos por ativar a proteína quinase dependente de AMPC (PKA). Isso é válido também para os neurônios nociceptivos, cuja sensibilização envolve a ativação da PKA (ALEY; LEVINE et al., 1999). Ainda existem evidências que o AMPC possa ativar uma outra proteína quinase, a proteína quinase $C\epsilon$ (PKC ϵ), independente da ativação da PKA (HUCHO et al., 2005).

A excitabilidade neuronal é controlada por canais iônicos presentes em sua membrana plasmática, sendo sua modulação provavelmente a etapa final na sensibilização dos nociceptores. De fato, a ativação das proteínas quinases (PKA e/ou PKC ϵ) tem sido implicada na modulação da atividade de canais iônicos, os quais apresentam resíduos de aminoácidos passíveis de fosforilação por estas enzimas. Uma vez fosforilados, a atividade destes canais é alterada, tornando-os mais ou menos ativos, o que altera as características elétricas da membrana, aumentando sua excitabilidade. Até o momento, os principais canais iônicos implicados na sensibilização dos nociceptores são os canais de sódio tetrodotoxina resistentes (TTX-R), NaV1.8 e NaV1.9. A fosforilação destes canais altera sua condutância e também seu limiar de ativação, levando, por fim, a uma diminuição do

limiar de ativação da célula neuronal (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1996; GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998; AKOPIAN et al., 1999; KHASAR et al., 1999b; RUSH; WAXMAN, 2004; AMAYA et al., 2006; MAINGRET et al., 2008). Ainda, pode ocorrer a fosforilação de canais de potássio dependentes de voltagem, que leva à sua inibição e, conseqüentemente, ao aumento do potencial de repouso do neurônio (NICOL et al., 1997; EVANS et al., 1999). De forma geral, tais modificações nestes canais (Na^+ e K^+) permitem a ativação do neurônio por estímulos anteriormente inócuos ou muito pouco efetivos.

No mesmo período em que se observou a importância do AMPc para a gênese da hiperalgesia/hipernocicepção inflamatória, já se sabia que em alguns sistemas biológicos o aumento de GMPc tinha efeitos opostos aos do AMPc (GOLDBERG et al., 1975). Nesse sentido, investigou-se o efeito do GMPc sobre a hipernocicepção induzida por PGE_2 . Assim, demonstrou-se que o dibutilil-GMPc era capaz de reverter a hipernocicepção instalada (FERREIRA; NAKAMURA 1979a).

1.9 Participação da via L-Arginina-NO-GMPc na dor inflamatória

O NO é uma molécula gasosa envolvida em vários processos fisiológicos, como vasodilatação, citotoxicidade de macrófagos, neurotoxicidade e plasticidade neuronal central (SCHUMAN & MADISON, 1). Como descrito anteriormente, o NO é sintetizado a partir da L-arginina em uma reação catalisada por uma família de enzimas conhecidas como NOS (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) (Esquema 1). O NO formado ativa a enzima guanilato ciclase, que produz um aumento nos níveis de GMPc (MELLER & GEBHART, 1993).

Várias evidências apontam para o envolvimento do NO no processo nociceptivo, tanto periférico como central. Entretanto os efeitos descritos nestes inúmeros estudos mostram tanto efeitos pró-nociceptivos quanto antinociceptivos. A maioria dos dados que indicam a participação do NO na nocicepção no sistema nervoso central são baseados em efeitos antinociceptivos de inibidores da NOS, como os demonstrados em modelos de hipernocicepção mecânica ou térmica em roedores (PRZEWLOCKI et al., 1993; PRZEWLOCKA et al., 1994; INOUE et al., 1997) ou de dor química persistente (HALEY et al., 1992; MOORE et al., 1992; BABBEDGE et al., 1993; MALMBERG & YAKSH, 1993; HAO & XU, 1996; MACHELSKA et al., 1997), os quais foram interpretados como uma ação pró-

nociceptiva do NO. No entanto o efeito antinociceptivo dos inibidores de NOS não foi confirmado em alguns experimentos também usando modelos de hipernocicepção mecânica ou térmica em roedores (MELLER et al., 1992; ZHUO et al., 1993; IWAMOTO & MARION, 1994; XU et al., 1995; MACHELSKA et al., 1997; ALEY et al., 1998) ou de dor química persistente (GOETTL & LARSON, 1996). Consistente com a hipótese de efeito pró-nociceptivo central do NO, alguns experimentos demonstraram que a administração intratecal de doadores de NO, como SIN-1 (PRZEWLOCKI et al., 1993), SNAP (PRZEWLOCKA et al., 1994) e NOC-18 (INOUE et al., 1997) apresentava um efeito hipernociceptivo em modelos de hipernocicepção mecânica ou térmica em ratos. Entretanto, Sousa e Prado (2001) demonstraram que a administração intratecal de baixas doses de SIN-1 reduzia a hipernocicepção mecânica induzida pela ligadura do nervo ciático, enquanto altas doses não tinham efeito, ou aumentavam a hipernocicepção mecânica. Em contraste, a administração intratecal de SIN-1 apresentava apenas efeito antinociceptivo no teste do “tail flick” em ratos. Assim, as razões para estes resultados discrepantes na literatura parecem ser devido aos diferentes modelos e as diferentes doses das drogas utilizadas.

Com relação ao efeito periférico do NO, a literatura também apresenta efeitos controversos. Inibidores de NOS, administrados por via intraplantar, não apresentaram efeitos no modelo de pressão plantar em ratos (ALEY et al., 1998) ou no teste da formalina (GRANADO-SOTO et al., 1997; AGUIRRE-BAÑUELOS & GRANADOS-SOTO, 1999). Entretanto, estudos brasileiros de Duarte e Ferreira (2000) relataram que a administração de um inibidor de NOS (L-NAME) levava a um potente efeito inibidor na hipernocicepção induzida pela administração intraplantar de carragenina no teste de Randall-Sellitto modificado em ratos, apesar de relatos anteriores demonstrarem, no mesmo teste, que a administração do precursor de NO, L-arginina, tanto por via intraplantar (DUARTE et al., 1990; KAWABATA et al., 1992b; Nakamura et al., 1996) quanto subcutânea (KAWABATA et al., 1992a), também reduzia a hipernocicepção induzida por carragenina.

Por outro lado, a hipernocicepção induzida pela administração intraplantar de L-arginina foi relatada por Aley et al. (1998) no mesmo teste de pressão plantar em ratos. No teste da formalina em camundongos, baixas doses de L-arginina por via intraplantar aumentaram a resposta na primeira fase, enquanto altas doses reduziram a resposta na segunda fase (KAWABATA et al., 1994). Por outro lado, a

L-arginina tem sido relatada como capaz de aliviar alguns tipos de dor crônica de pacientes (TAKAGI et al., 1990; HARIMA et al., 1991).

A administração periférica de doadores de NO tanto em animais de laboratório quanto em humanos também tem levado a resultados discrepantes. SIN-1 por via intraplantar induziu hipernocicepção no teste de pressão plantar em ratos (ALEY et al., 1998), enquanto nitroprussiato de sódio (200-500 μg) (DUARTE et al., 1990), SIN-1 (50-100 μg) (FERREIRA et al., 1991) ou SNAP (50-200 μg) (CUNHA et al., 1999) por via intraplantar reduziram a hipernocicepção induzida por PGE_2 no teste de pressão plantar em ratos. Em voluntários humanos, o NO, dissolvido em solução tampão de fosfato isoosmolar, provocou dor após administração intradérmica (HOLTHUSEN & ARNDT, 1994). Em contraste, o gliceril trinitrato reduziu a dor induzida pela escleroterapia de veias da perna (BERRAZUETA et al., 1994) e controlou a dor em mulheres com dismenorréia grave (PITTROF et al., 1996). A nitroglicerina transdérmica foi benéfica no manuseio da dor no ombro secundária a tendinite do supraespinhoso (BERRAZUETA et al., 1995) e como coadjuvante na terapia com opióides para controle da dor em pacientes com câncer (LAURETTI et al., 1999a).

A explicação para estes efeitos controversos do NO na hipernocicepção periférica pode novamente ser atribuído a dosagem das drogas utilizadas. Assim, baixas concentrações de NO parecem ser antinociceptivas, enquanto altas concentrações parecem ser pró-nociceptivas. Assim, Prado et al. (2002), utilizando um modelo em ratos de dor pós-operatória persistente, avaliou o efeito da aplicação local de creme hidrofóbico contendo várias concentrações de doadores de NO (dinitrato de isosorbide ou SNAP), concluindo que a aplicação de drogas que geravam baixas concentrações de NO reduziam a intensidade da dor incisional, enquanto àquelas que geravam altas concentrações de NO intensificavam a dor incisional.

A descoberta de que o NO produzido pela ativação da enzima NOS ativava a guanilato ciclase, com conseqüente produção de GMPc (KNOWLES et al., 1989), associada à viabilização de ferramentas farmacológicas específicas que inibem a via NO/GMPc, permitiram demonstrar que o NO bloqueia a hipernocicepção mecânica, sendo este efeito mediado por GMPc (DUARTE et al., 1990).

Conforme mencionado, a excitabilidade neuronal depende da modulação da atividade de certos canais iônicos. Dessa forma, seria esperado que a ativação

da via NO/GMPc modulasse a atividade de alguma população de canais iônicos, finalmente restabelecendo a excitabilidade neuronal normal. Nesse sentido, a ativação desta via metabólica intracelular pelas drogas analgésicas bloqueadoras diretas da hiperalgesia/hipernocicepção parece se contrapor à sensibilização dos nociceptores por promover a abertura dos canais K^+_{ATP} (RODRIGUES, DUARTE, 2000). Esta modulação, possivelmente, favorece o efluxo deste íon, de modo a contrabalancear o limiar neuronal aumentado devido às alterações funcionais dos canais de Na^+ e K^+ associados à sensibilização. Neste sentido, foi demonstrado que o bloqueio pela morfina, dipirona, nitroprussiato de sódio, e dibutilil-GMPc na hipernocicepção induzida por PGE_2 foi antagonizado por inibidores específicos dos canais K^+_{ATP} , como glibenclamida e tolbutamina (Rodrigues & Duarte, 2000; Soares et al., 2000; Soares & Duarte, 2001; Alves & Duarte, 2002).

Com relação ao PCI, não existe nenhum relato na literatura sobre seus efeitos na hipernocicepção. Devido às controvérsias da literatura no que se refere ao papel do NO no PCI-r, e ao fato de parecer ser a abertura dos canais K^+_{ATP} a via final do efeito protetor do PCI na lesão de reperfusão (TAPURIA et al., 2008), no presente trabalho foi proposto investigar se o PCI-r apresenta um efeito antinociceptivo e se este efeito ocorre através da via NO-GMPc- canais K^+_{ATP} .

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

2.1.1 Avaliar os mecanismos e mediadores envolvidos no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico remoto no recrutamento de neutrófilos e sobre a hipernocicepção no curso da resposta inflamatória.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar o efeito do Pré-condicionamento Isquêmico remoto no rolamento leucocitário, adesão ao endotélio venular e na migração de neutrófilos, *in vivo*, durante a resposta inflamatória à distância.

2.2.2 Avaliar a contribuição da via L-Arginina-NO-GMPc e dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico remoto na migração de neutrófilos induzida por carragenina durante a resposta inflamatória à distância.

2.2.3 Estudar o efeito inibitório do Pré-condicionamento Isquêmico remoto sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por carragenina em cavidade peritoneal.

2.2.4 Avaliar o efeito do Pré-condicionamento Isquêmico remoto na hipernocicepção mecânica na pata contralateral durante a resposta inflamatória.

2.2.5 Avaliar a contribuição da via L-Arginina-NO-GMPc e dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico remoto na hipernocicepção mecânica induzida por PGE₂ na pata contralateral durante a resposta inflamatória.

3 MÉTODO

3.1 Animais

Para os experimentos de migração de neutrófilos foram utilizados camundongos machos, das linhagens C57BL/6 (selvagens - “wild type”) e camundongos com deleção gênica da NOSi (NOSi^{-/-}), todos pesando de 18 a 20g. Os animais foram mantidos nos Departamentos de Farmacologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob condições de temperatura (22-25°C), sem restrição hídrica ou dietética (*ad libitum*) e ciclo claro/escuro controlados. Os camundongos geneticamente modificados foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, U.S.A).

Para os experimentos de hipernocicepção mecânica foram utilizados ratos (*Mamalia Rodentia, Muridae, Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 250 gramas, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram alimentados com dieta padrão de laboratório (Labina[®], Ração para Ratos, Camundongos e Hamsters – Ralston Purina do Brasil LTDA. – Paulínia – SP) e água à vontade. Foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em número máximo de seis por gaiola de polipropileno (40 x 30 x 15 cm). Permaneceram em ambiente climatizado, à temperatura média de 25°C, umidade relativa do ar em torno de 60% e iluminação adequada, obedecendo ao ciclo dos dias e noites, conforme preceitos do Guia de Cuidados e Utilização dos Animais de Laboratório do “U.S. Department of Health and Human Services” (1985).

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), as diretrizes para uso de animais experimentais em estudos de dor da IASP (ZIMMERMANN, 1983) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Protocolo N° 094/09) (Anexo).

3.2 Drogas

- a) **Carragenina – Sigma** – dissolvida em salina 0,9%;
- b) **Prostaglandina E₂ (PGE₂)– Sigma** - dissolvida em salina 0,9%;
- c) **Aminoguanidina** (inibidor seletivo da NOS induzida) – **Sigma** – dissolvida em PBS;
- d) **NG-Monometil-L-Arginina (L-NMMA)**; inibidor não seletivo da NOS) - **Tocris Cookson** - dissolvido em salina 0,9%;
- e) **S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP)**; doador de NO) - **Tocris Cookson** - dissolvido em salina 0,9%;
- f) **1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one (ODQ)**; inibidor da guanilato ciclase) - **Tocris Cookson** – dissolvido em PBS-DMSO 1%;
- g) **Glibenclamida** (bloqueador de canal de potássio) – **Sigma** – dissolvido em salina 0,9% - Tween 20 2%

3.3 Preparo de Soluções e Corantes

3.3.1 Tampão salina-fosfato (PBS)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck),.....	8,0 g
Cloreto de Potássio (KCl, Merck),.....	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ , Merck),.....	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH ₂ PO ₄ , Merck),.....	0,2 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p.....	1000ml

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada e estocada em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

3.3.2 PBS/EDTA

PBS.....	100 ml
EDTA (Merck).....	37.2 mg

3.3.3 PBS/TWEEN

PBS.....	1000 ml
TWEEN (Sigma).....	1.0 ml

3.3.4 Corante Panótico Rápido (LaborClin)

Panótico rápido n° 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.

Panótico rápido n° 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%.

Panótico rápido n° 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

3.3.5 Corante Azul de Evans

Azul de Evans (SIGMA)2,5g

Água destilada.....100ml

3.4 Modelos Experimentais

3.4.1 Indução do Pré-condicionamento Isquêmico na pata posterior de rato

O PCI na pata posterior foi realizado, em ratos anestesiados com éter dietílico, por meio de aplicação de um torniquete com faixa elástica na região proximal da pata posterior direita por um período de 10 minutos (Figura 3). Imediatamente após a aplicação do torniquete era realizada injeção e.v. de uma solução a 2,5% de azul de Evans, na dose de 25 mg/kg, através do plexo venoso dorsal do pênis (Figura 4). Este procedimento teve por finalidade validar o modelo de isquemia completa da pata posterior, uma vez que a mesma quando isquêmica era o único local do corpo do animal que não era corado pelo azul de Evans (Figura 5). Após os 10 minutos de isquemia realizou-se a liberação do torniquete e a reperfusão da pata posterior direita foi claramente evidenciada e comprovada pelo aparecimento do corante na pata posterior previamente não corada (Figura 6). O período de reperfusão foi de 30 minutos e somente após o término do mesmo foi realizada a avaliação do efeito do PCI no modelo de hipernocicepção mecânica na pata contralateral. Para o procedimento SHAM os animais foram anestesiados da mesma forma, entretanto não foi realizada aplicação do torniquete e os modelos experimentais foram testados após 40 minutos (Figura 7).



FIGURA 3 – Aplicação do torniquete com faixa elástica.

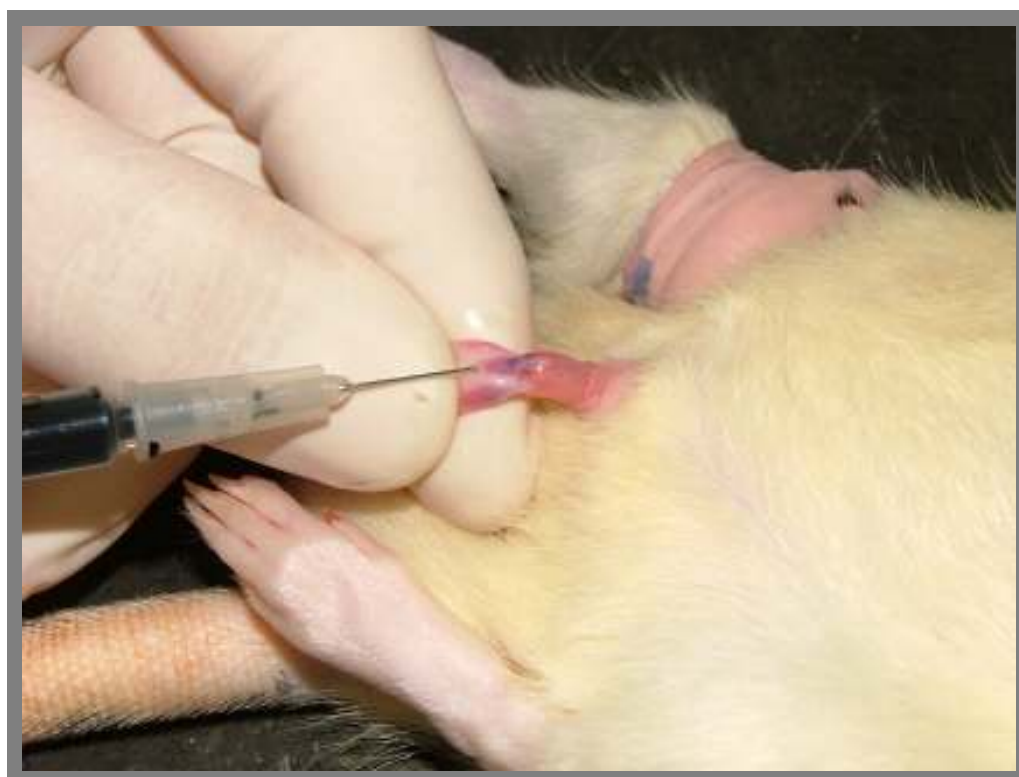


FIGURA 4 – Aplicação de azul de Evans através do plexo venoso dorsal do pênis.



FIGURA 5 – Distribuição do azul de Evans por todo o corpo do animal, exceto pela pata isquêmica.

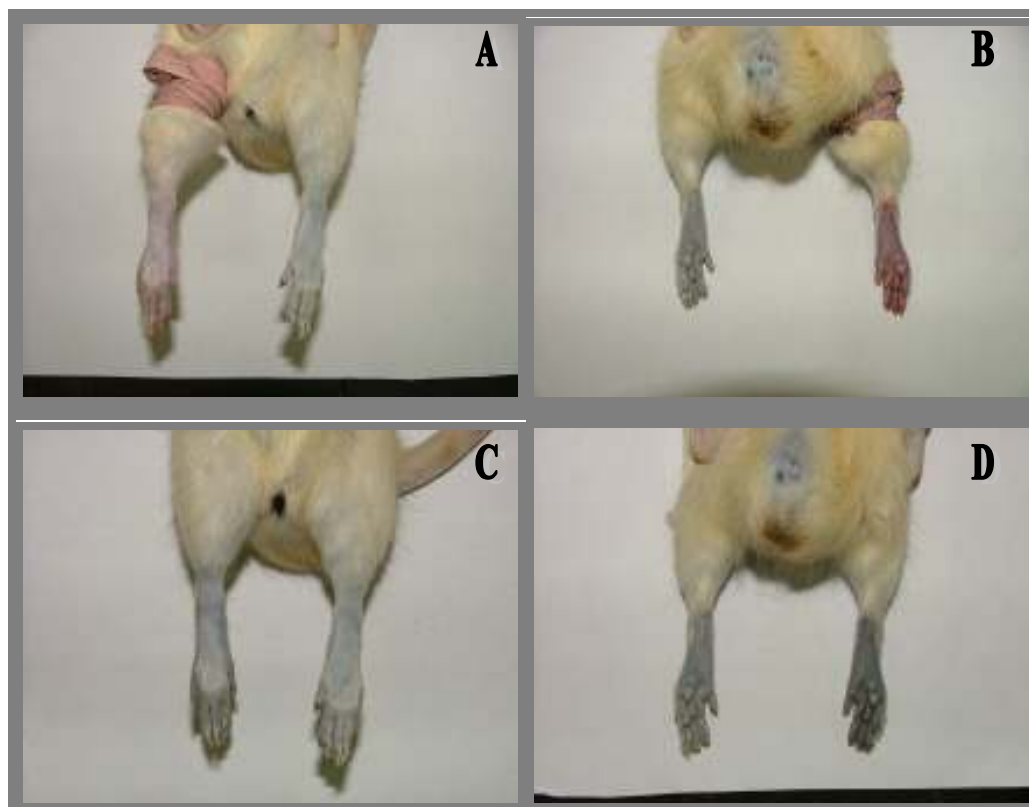


FIGURA 6 – Comparação das patas posteriores após 10 minutos de isquemia (A: visão ventral; B: visão dorsal) e logo após a liberação do torniquete (C: visão ventral; D: visão dorsal).

3.4.2 Indução do Pré-condicionamento Isquêmico na pata posterior de camundongos

O PCI na pata posterior de camundongos foi realizado semelhante ao método utilizado em ratos. Assim, os camundongos foram anestesiados com éter dietílico e o PCI foi induzido por meio de aplicação de um torniquete com faixa elástica na região proximal da pata posterior direita por um período de 10 minutos. Imediatamente após a aplicação do torniquete era realizada injeção e.v. de uma solução a 2,5% de azul de Evans, na dose de 25 mg/kg, através do plexo venoso orbitário. Após os 10 minutos de isquemia realizou-se a liberação do torniquete. O período de reperfusão foi de 30 minutos e somente após o término do mesmo foi realizada a avaliação do efeito do PCI no modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal. Para o procedimento SHAM os animais foram anestesiados da mesma forma, entretanto não foi realizada aplicação do torniquete e os modelos experimentais foram testados após 40 minutos. Para quantificação da extração de azul de Evans durante o PCI, em um grupo separado os animais foram sacrificados cinco minutos após a aplicação do torniquete (durante o período de isquemia) e cinco a 30 minutos após a retirada do mesmo (durante o período de reperfusão). Após o sacrifício os animais tiveram suas patas direita e esquerda retiradas, pesadas e colocadas em um frasco contendo 2 ml de formamida com a finalidade de extração do azul de Evans previamente administrado na dose de 25 mg/kg. Posteriormente determinou-se a quantidade de azul de Evans extraída por pata através da mudança de densidade óptica (DO) a 630 nm de cada amostra, comparada com a DO de uma curva de azul de Evans com concentrações conhecidas, semelhante ao método empregado por Garcia Leme e Wilhelm (1975). Os resultados foram quantificados em μg de azul de Evans/ g de tecido e expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) (Figura 7).

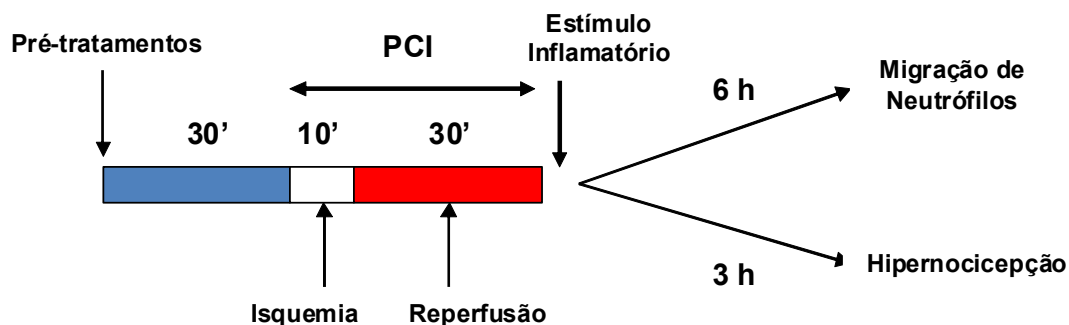


FIGURA 7 – Delineamento experimental do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico na migração de neutrófilos e na hipernociceção.

3.4.3 Migração de neutrófilos *in vivo*

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos foi avaliada 6 horas após a administração intraperitoneal (i.p.) de carragenina (500 mg/cavidade). Os animais foram sacrificados, a pele do abdômen foi aberta com uma incisão mediana sem lesar a musculatura e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 ml de tampão PBS contendo EDTA (1 mM; PBS/EDTA). A partir do lavado peritoneal foram realizadas as contagens total e diferencial das células.

A contagem total dos leucócitos na cavidade peritoneal foi realizada em contador automático de células (COULTER[®] A^C T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA), e expressa como número de células x 10⁶/ml.

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) de uma alíquota de 40 µl do lavado peritoneal. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos. A quantificação de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela percentagem das células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁶ /ml.

3.4.4 Microscopia Intravital

Os animais foram preparados para a avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio venular do leito mesentérico, 2 e 4 horas, respectivamente, após a administração i.p. de carragenina. Os procedimentos empregados para avaliar rolamento e adesão leucocitária nas células endoteliais, através da técnica de microscopia intravital, foram previamente descritos (BAEZ, 1969; FORTES et al., 1991). Os animais foram, previamente, anestesiados com injeção i.p. de tribromoetanol 2.5 % (10 μ l/ 10 g) e, através de uma incisão lateral na parede abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37°C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de Ringer-Locke ou salina estéril a 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estavam acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, uma câmera e um monitor de vídeo que permitiu a projeção e gravação das imagens. O aumento final foi de 3400 vezes (Figura 8). Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando entre 8 a 12 μ m. Duas horas após a administração do estímulo inflamatório (carragenina), avaliou-se o rolamento de leucócitos aos vasos do mesentério, sendo analisados três vasos por animal, durante 10 minutos cada vaso, estimando-se o resultado como média de todos. Os resultados do rolamento foram expressos como número de leucócitos que rolaram por minuto. Quatro horas após a administração de carragenina avaliou-se o número de leucócitos aderidos no endotélio ao longo de uma extensão de 100 μ m² de vênula. Esta foi definida na tela do monitor: 10 μ m no tecido correspondem a 3.4 cm na tela. Uma dada seção do leito vascular foi testada somente uma vez para a determinação do número de leucócitos aderidos no endotélio. Três determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de todos. O número de células aderidas foi avaliado utilizando-se imagens gravadas, sendo expressos como células aderidas/100 μ m².



FIGURA 8 – Modelo de Microscopia Intravital.

3.4.5 Quantificação de TNF- α , IL-1 β e KC

Os níveis de TNF- α , IL-1 β e KC foram detectados no exsudato peritoneal pelo método imunoenzimático ELISA (TAKTAK; LEE, 1991), descrito a seguir. Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ l/ poço do anticorpo específico anti-TNF- α (2 μ g/mL), anti-IL-1 β (2 μ g/mL) ou anti-KC (4 μ g/mL) (R&D systems). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação (coating buffer) pH 7.2 e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0.05%; Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ l de PBS/BSA 1% por 120 minutos em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para TNF- α (2000 pg/ml), IL-1 β (2000 pg/ml) e KC (4000 pg/ml) (R&D systems) foram colocados nas placas (50 μ l) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 e 50 μ l dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações: TNF- α (1:1000), IL-1 β (1:1000) ou KC (1:1000). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20, e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1:5000 adicionado a cada poço e as placas incubadas por 30 minutos. As placas foram lavadas com PBS/Tween-20 e,

em seguida foi adicionado 50 μ l do substrato OPD (o-fenilenediamina-dihidroclorato; Sigma) em tampão substrato (pH 5.0). A reação foi interrompida com 50 μ l de H₂SO₄ (1 M) e, a densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em pg de TNF- α , IL-1 β ou KC/mL do exsudato peritoneal.

3.4.6 Hipernocicepção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).

Todos os testes nociceptivos foram realizados entre 8 e 17 horas. A avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizada pelo método de pressão crescente na pata de ratos, previamente descrito (VIVANCOS et al., 2004). Resumidamente, este método utiliza-se de um analgesímetro digital (eletronic Von-Frey - analgesímetro digital, Insight[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil, Figura 9). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável de 0,7 mm² que estimula diretamente a pata do animal (Figura 10). O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma flexão da pata seguida por um “flinch” após a retirada da pata em contato com o aparelho. O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica foi registrada. O experimentador, inicialmente faz uma triagem dos animais que respondem de modo adequado, um dia antes do experimento. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, antes e após a administração dos estímulos nociceptivos, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na força (Δ de reação em gramas), que é o valor mensurado no tempo zero subtraído do valor mensurado nas horas após a injeção do estímulo nociceptivo.

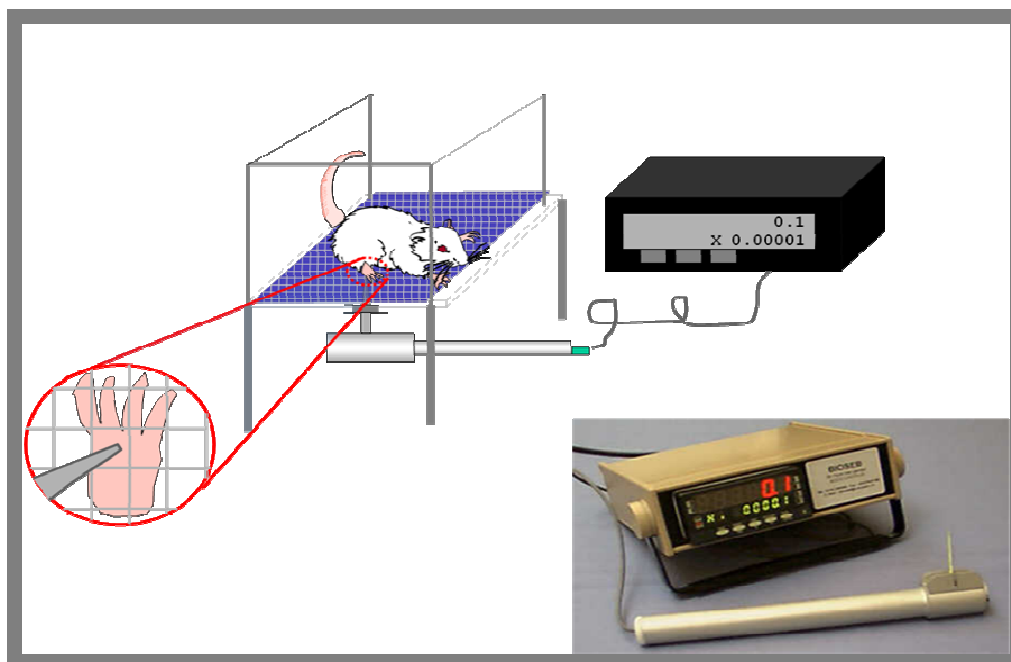


FIGURA 9 - Hipernociceção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).



FIGURA 10 – Aferição da hipernociceção mecânica em patas de ratos: Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo $12 \times 20 \times 17$ cm, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5 mm^2 constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas foram mantidas a uma distância de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo a permitir a estimulação mecânica da pata traseira dos animais. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por quinze minutos para a adaptação.

3.5 Protocolos Experimentais

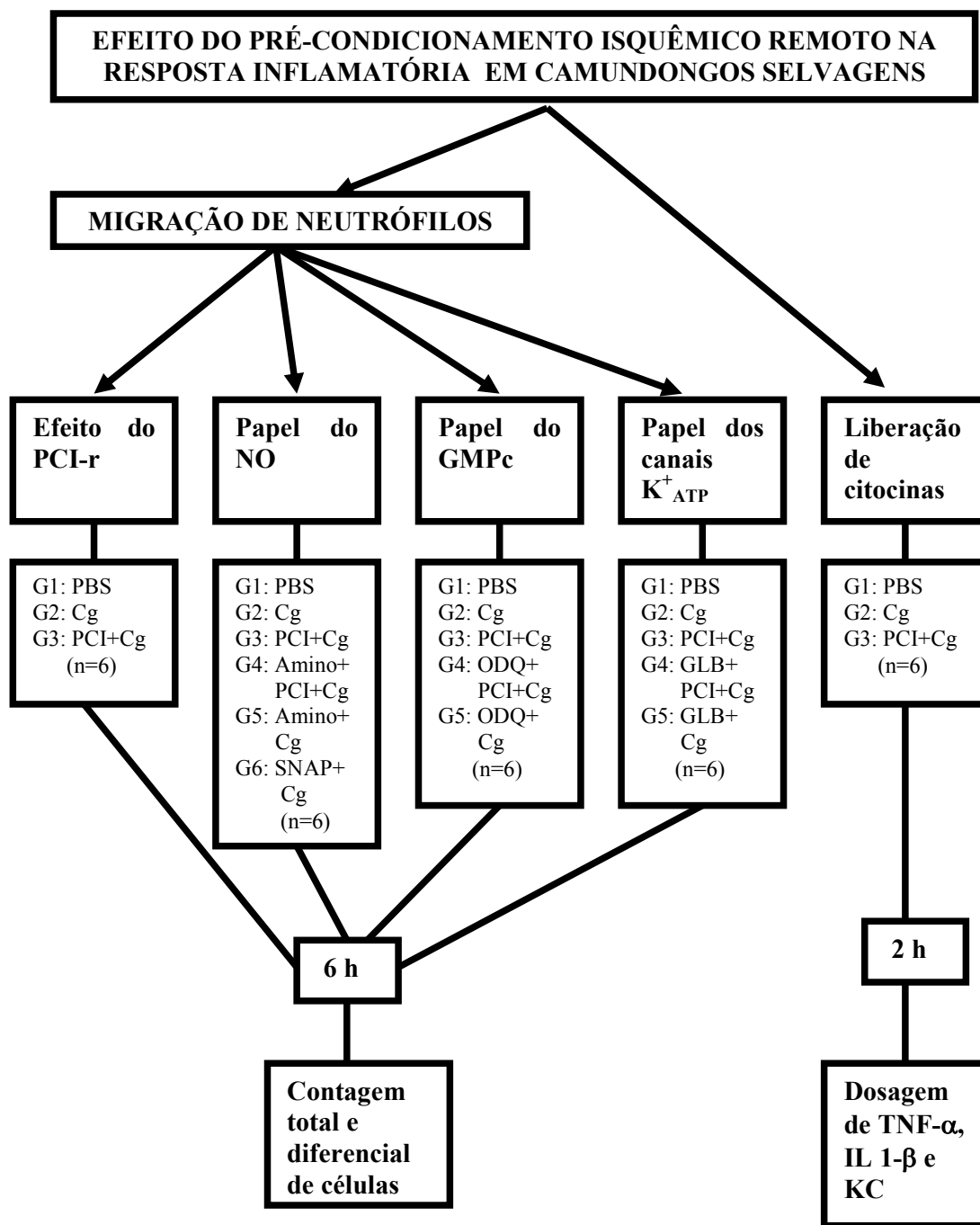


FIGURA 11 – Avaliação do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em camundongos selvagens. PBS: Tampão salina-fosfato; Cg: carragenina; PCI: Pré-condicionamento Isquêmico; Amino: aminoguanidina; ODQ: 1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one; GLB: glibenclamida.

3.5.1 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Dezoito camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em três grupos: o primeiro grupo recebeu apenas PBS (0,2 ml) por via i.p.; no segundo grupo foi injetado carragenina (500 µg/cavidade) i.p.; e no terceiro realizou-se a indução do PCI da pata posterior direita imediatamente antes da administração i.p. de carragenina (500 µg/cavidade). Seis horas após a administração i.p. dos estímulos (PBS ou carragenina), os animais foram sacrificados e o número de neutrófilos presente no lavado peritoneal foi determinado como descrito anteriormente (Figura 11).

3.5.2 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Trinta e seis camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em seis grupos: o primeiro grupo recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p.; e nos outros cinco grupos foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade) i.p. Em um destes cinco últimos grupos foi realizada somente a administração i.p. de carragenina; em outro o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina; em outro se realizou o pré-tratamento dos animais por via subcutânea (s.c.) com o inibidor seletivo da NOSi, aminoguanidina (100 mg/kg) trinta minutos antes da realização do PCI, sendo a carragenina injetada i.p. imediatamente após a indução do PCI; em outro grupo a administração s.c. de aminoguanidina (100 mg/kg) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM e setenta minutos antes da injeção i.p. de carragenina; e no último grupo o doador de NO, SNAP (3 mg/kg) foi administrado s.c. trinta minutos antes da injeção i.p. de carragenina. Seis horas após a administração i.p. dos estímulos (PBS ou carragenina), os animais foram sacrificados e o número de neutrófilos presente no lavado peritoneal foi determinado como descrito anteriormente (Figura 11).

3.5.3 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Trinta camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em cinco grupos: o primeiro grupo recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p.; e nos outros quatro grupos foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade) i.p. Em um destes quatro últimos grupos foi realizada somente a administração i.p. de carragenina; em outro o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina; em outro grupo se realizou o pré-tratamento dos animais por via i.p. com o inibidor da GC, ODQ (5 µmol/kg) trinta minutos antes da realização do PCI, sendo a carragenina injetada i.p. imediatamente após a indução do PCI; no último grupo a administração i.p. de ODQ (5 µmol/kg) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM e setenta minutos antes da injeção i.p. de carragenina. Seis horas após a administração i.p. dos estímulos (PBS ou carragenina), os animais foram sacrificados e o número de neutrófilos presente no lavado peritoneal foi determinado como descrito anteriormente (Figura 11).

3.5.4 Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Trinta camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em cinco grupos: o primeiro grupo recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p.; e nos outros quatro grupos foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade) i.p. Em um destes quatro últimos grupos foi realizada somente a administração i.p. de carragenina; em outro o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina; em outro grupo se realizou o pré-tratamento dos animais por via s.c. com o bloqueador dos canais de K^+_{ATP} , glibenclamida (20 mg/kg) trinta minutos antes da realização do PCI, sendo a carragenina injetada i.p. imediatamente após a indução do PCI; no último grupo a administração i.p. de glibenclamida (20 mg/kg) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM e setenta minutos antes da injeção i.p. de carragenina. Seis horas após a administração i.p. dos estímulos (PBS ou carragenina), os animais

foram sacrificados e o número de neutrófilos presente no lavado peritoneal foi determinado como descrito anteriormente (Figura 11).

3.5.5 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal

Quinze camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em três grupos: o primeiro recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p., no segundo foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 μ g/cavidade) i.p.; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina. As células da cavidade peritoneal foram coletadas com 0.5 ml do meio RPMI contendo EDTA (0.1 M) 2 h após a injeção i.p. de carragenina, e estas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 6 h. As concentrações de TNF- α , IL-1 β ou KC foram determinadas no sobrenadante do exudato peritoneal pelo método ELISA, descrito anteriormente (Figura 11).

3.5.6 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o rolamento, adesão leucocitária ao endotélio venular e migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos por carragenina em camundongos selvagens e NOSi-/-

Inicialmente, quinze camundongos C57BL/6 (selvagens -“wild type”) foram divididos em três grupos: o primeiro recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p., no segundo foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 μ g/cavidade) i.p.; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina. Quinze camundongos NOSi-/- foram divididos em outros três grupos: o primeiro recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p., no segundo foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 μ g/cavidade) i.p.; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina. Após 2 h (para o rolamento) ou 4 h (para adesão no endotélio) da administração do estímulo inflamatório (PBS ou carragenina), os animais foram preparados para a avaliação da microscopia intravital, descrito anteriormente. Esses parâmetros foram determinados em vênulas de cinco diferentes campos na porção ileocecal da microcirculação mesentérica (Figura 12).

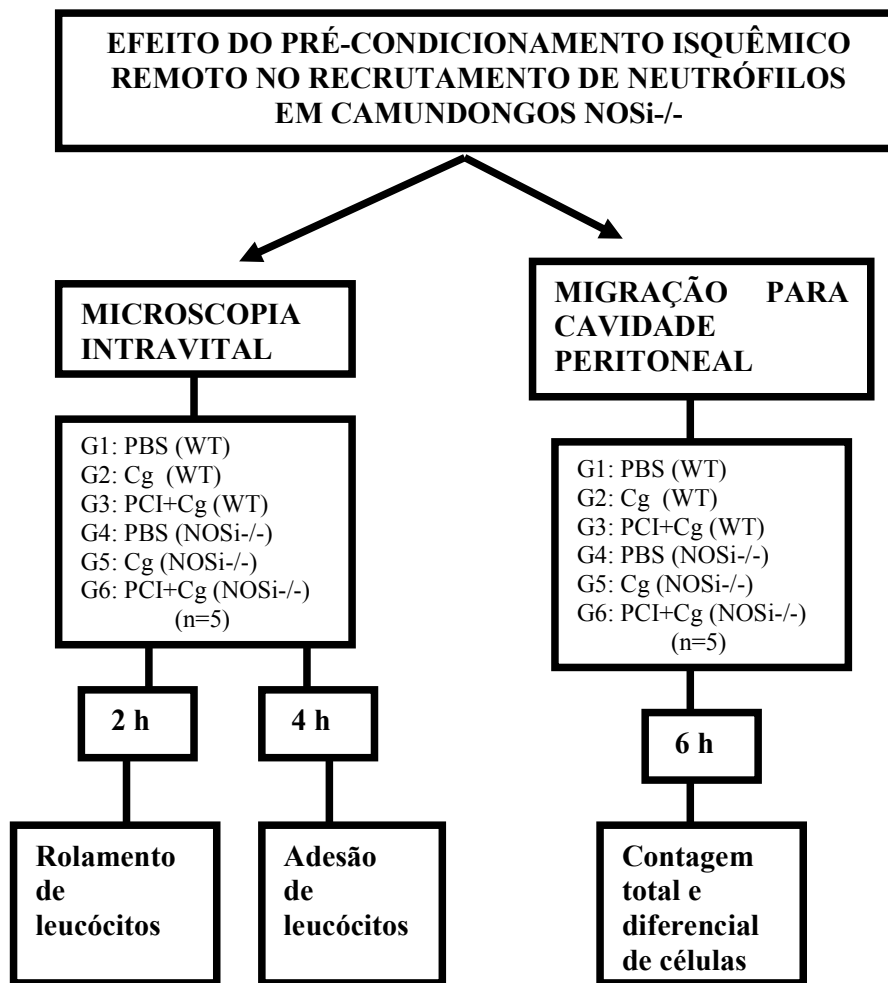


FIGURA 12 – Avaliação do efeito do Pré-condicionamento isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em camundongos NOSi^{-/-}. PBS: Tampão salina-fosfato; Cg: carragenina; PCI: Pré-condicionamento Isquêmico; WT: camundongos selvagens – “wild type”; NOSi^{-/-}: camundongos deficientes para a enzima NO sintase induzida.

Posteriormente, outros quinze camundongos C57BL/6 (selvagens – “wild type”) foram divididos em três grupos: o primeiro recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p., no segundo foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade) i.p.; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina. Outros quinze camundongos NOSi^{-/-} foram divididos em outros três grupos: o primeiro recebeu apenas PBS (0.2 ml) por via i.p., no segundo foi administrado como estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade) i.p.; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.p. de carragenina. Seis horas após a administração i.p. dos estímulos (PBS ou carragenina), os animais foram sacrificados e o número

de neutrófilos presente no lavado peritoneal foi determinado como descrito anteriormente (Figura 12).

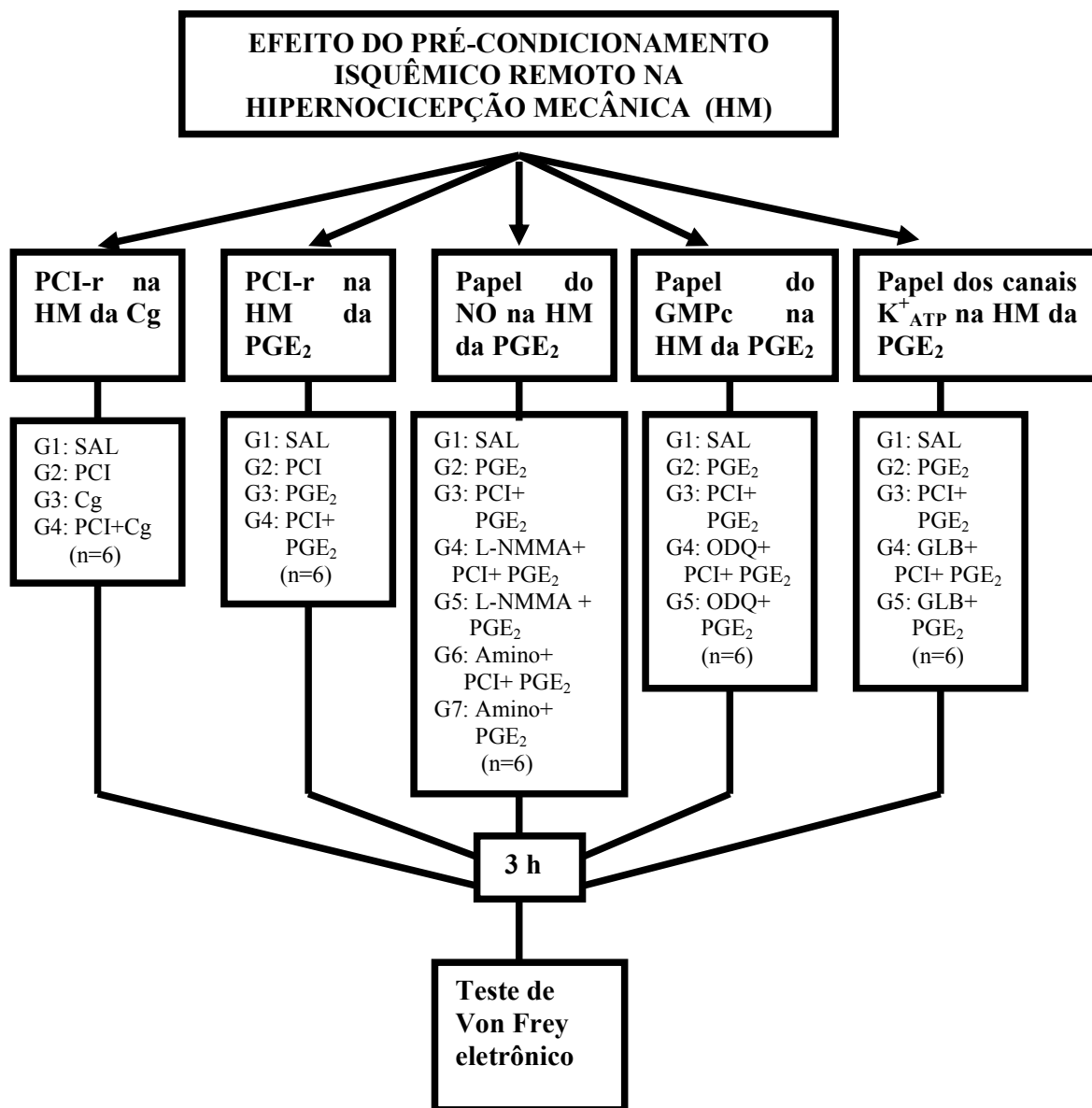


FIGURA 13 – Avaliação do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior direita na hipernocicepção mecânica da pata posterior esquerda. SAL: salina; PCI: Pré-condicionamento Isquêmico; Cg: carragenina; PGE₂: prostaglandina E₂; L-NMMA: NG-Monometil-L-Arginina ; Amino: aminoguanidina; ODQ: 1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one; GLB: glibenclamida.

3.5.7 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos

Vinte e quatro ratos foram divididos em quatro grupos: o primeiro recebeu apenas salina (50 μ l) por via intraplantar (i.pl.) esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM; no segundo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de salina (50 μ l); no terceiro grupo a hipernocicepção mecânica foi induzida com a administração i.pl. esquerda de carragenina (300 μ g/pata) quarenta minutos após o procedimento SHAM; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de carragenina (300 μ g/pata). Três horas após a administração i.pl. dos estímulos (salina ou carragenina), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado conforme descrito anteriormente (Figura 13).

3.5.8 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

Vinte e quatro ratos foram divididos em quatro grupos: o primeiro recebeu apenas salina (50 μ l) por via intraplantar (i.pl.) esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM; no segundo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de salina (50 μ l); no terceiro grupo a hipernocicepção mecânica foi induzida com a administração i.pl. esquerda de PGE₂ (400 ng/pata) quarenta minutos após o procedimento SHAM; e no último grupo o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de PGE₂ (400 ng/pata). Três horas após a administração i.pl. dos estímulos (salina ou PGE₂), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado conforme descrito anteriormente (Figura 13).

3.5.9 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

Quarenta e dois ratos foram divididos em sete grupos: o primeiro grupo recebeu apenas salina (50 μ l) por via i.pl. esquerda; e nos outros seis grupos a hipernocicepção mecânica foi induzida com a administração i.pl. esquerda de PGE₂ (400 ng/pata). Em um destes seis últimos grupos foi realizada somente a administração i.pl. esquerda de PGE₂; em outro o PCI da pata posterior direita foi

realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de PGE₂; em outro se realizou o pré-tratamento dos animais por via i.pl. esquerda com o inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA (50 µg/pata) trinta minutos antes da realização do PCI, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda imediatamente após a indução do PCI da pata direita; em outro grupo a administração i.pl. esquerda de L-NMMA (50 µg/pata) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM; no penúltimo grupo se realizou o pré-tratamento dos animais com o inibidor seletivo da NOSi, aminoguanidina (100 µg/pata) trinta minutos antes da realização do PCI, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda imediatamente após a indução do PCI da pata direita; e no último grupo a administração de aminoguanidina (100 µg/pata) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM. Três horas após a administração i.pl. dos estímulos (salina ou PGE₂), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado conforme descrito anteriormente (Figura 13).

3.5.10 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

Trinta ratos foram divididos em cinco grupos: o primeiro grupo recebeu apenas salina (50 µl) por via i.pl. esquerda; e nos outros quatro grupos a hipernocicepção mecânica foi induzida com a administração i.pl. esquerda de PGE₂ (400 ng/pata). Em um destes quatro últimos grupos foi realizada somente a administração i.pl. esquerda de PGE₂; em outro o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de PGE₂; em outro grupo se realizou o pré-tratamento dos animais por via i.pl. esquerda com o inibidor da GC, ODQ (8 µg/pata) trinta minutos antes da realização do PCI na pata direita, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda imediatamente após a indução do PCI da pata direita; no último grupo a administração i.pl. esquerda de ODQ (8 µg/pata) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM, sendo a PGE₂ injetada i.pl. esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM. Três horas após a administração i.pl. dos estímulos (salina ou PGE₂), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado conforme descrito anteriormente (Figura 13).

3.5.11 Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE_2 na pata contralateral de ratos

Trinta ratos foram divididos em cinco grupos: o primeiro grupo recebeu apenas salina (50 μ l) por via i.pl. esquerda; e nos outros quatro grupos a hipernocicepção mecânica foi induzida com a administração i.pl. esquerda de PGE_2 (400 ng/pata). Em um destes quatro últimos grupos foi realizada somente a administração i.pl. esquerda de PGE_2 ; em outro o PCI da pata posterior direita foi realizado imediatamente antes da injeção i.pl. esquerda de PGE_2 ; em outro grupo se realizou o pré-tratamento dos animais por via i.pl. esquerda com o bloqueador dos canais de K^+_{ATP} , glibenclamida (160 μ g/pata) trinta minutos antes da realização do PCI na pata direita, sendo a PGE_2 injetada i.pl. esquerda imediatamente após a indução do PCI da pata direita; no último grupo a administração i.pl. esquerda de glibenclamida (160 μ g/pata) foi realizada trinta minutos antes do procedimento SHAM, sendo a PGE_2 injetada i.pl. esquerda quarenta minutos após o procedimento SHAM. Três horas após a administração i.pl. dos estímulos (salina ou PGE_2), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado conforme descrito anteriormente (Figura 13).

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos foi realizado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm EPM, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Protocolo de Pré-condicionamento Isquêmico em camundongos

O protocolo de Pré-condicionamento Isquêmico remoto utilizado neste estudo foi obtido com a isquemia da pata posterior direita, colocando um garrote elástico de borracha na parte proximal do membro por 10 minutos e depois reperfundidos por 30 minutos após a sua retirada. A isquemia foi monitorada com a administração de Azul de Evans (25 mg/kg, iv) imediatamente após a indução da isquemia com o torniquete. A extração de azul de Evans foi significativamente menor no membro direito, durante a isquemia. Após a liberação do torniquete, a extração do azul de Evans em ambos os membros foi semelhante e persistiu por 30 minutos (Figura 14)

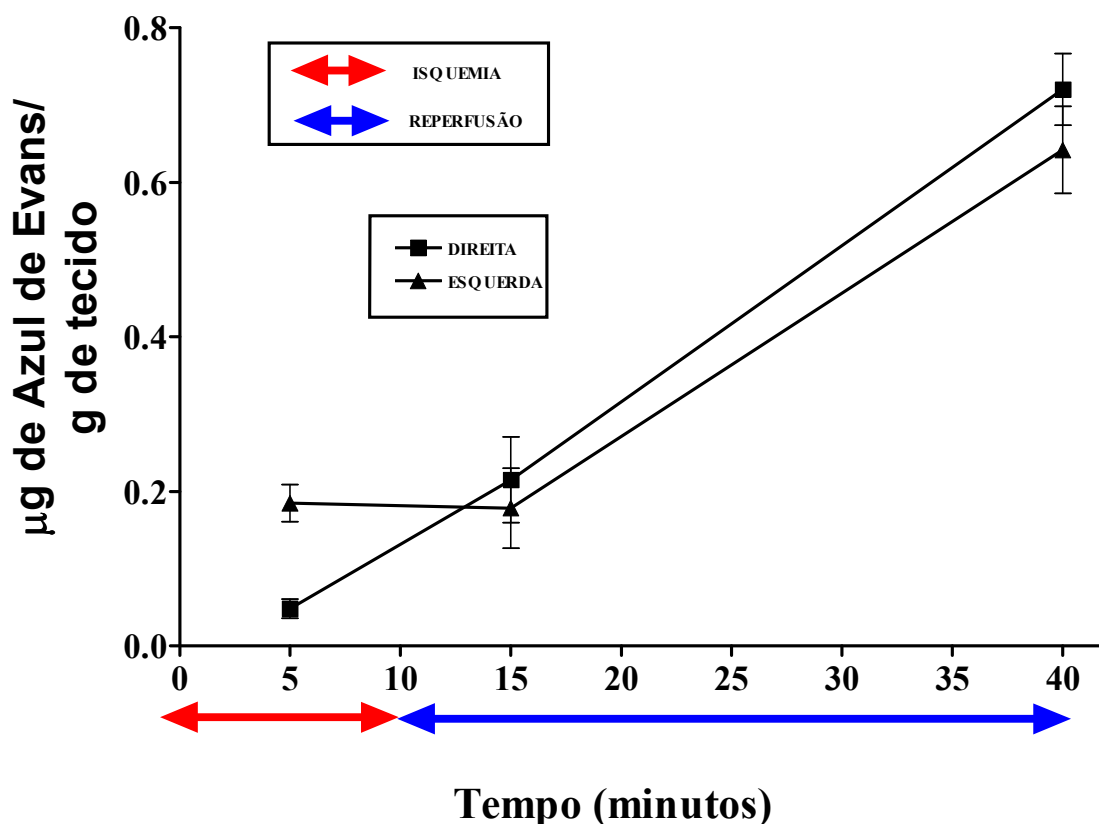


Figura 14 – Extração de Azul de Evans nas patas posteriores direita e esquerda durante o Pré-condicionamento Isquêmico em camundongos. ■: Pata posterior direita; ▲: Pata posterior esquerda; ◀▶: Período de isquemia do Pré-condicionamento Isquêmico; ▶▶: Período de reperfusão do Pré-condicionamento Isquêmico. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (*) $p < 0,05$, em comparação com o grupo pata direita. ANOVA – Teste de Tukey.

4.2 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Na Figura 15 observa-se que o PCI da pata posterior, quando realizado imediatamente antes da administração i.p. de carragenina, inibiu de forma significativa a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal ocorrida 6 horas após a administração de carragenina (79,01%, $p < 0,01$),.

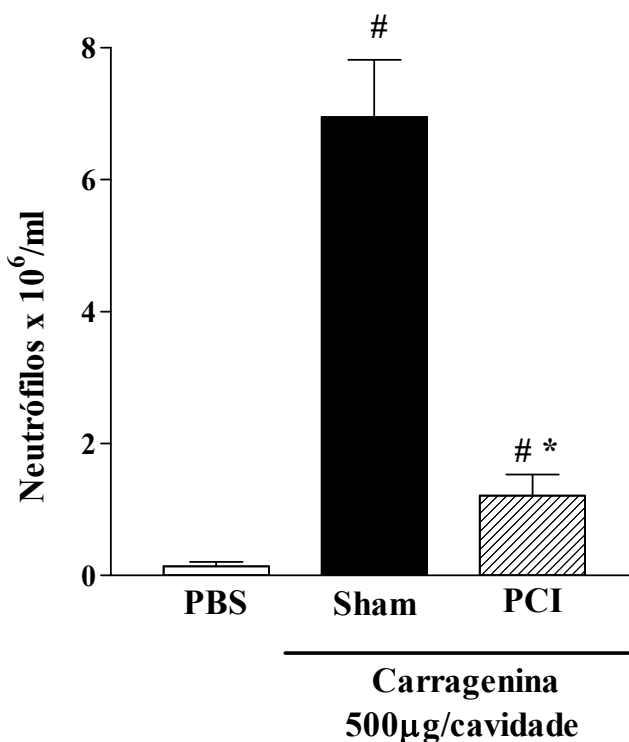


FIGURA 15 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

4.3 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

A administração de aminoguanidina trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior bloqueou de forma significativa o efeito inibitório do PCI na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. A administração de aminoguanidina trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. Por outro lado, a administração do SNAP, um doador de NO, trinta minutos antes da carragenina simulou o efeito do PCI inibindo de forma significativa a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Figura 16).

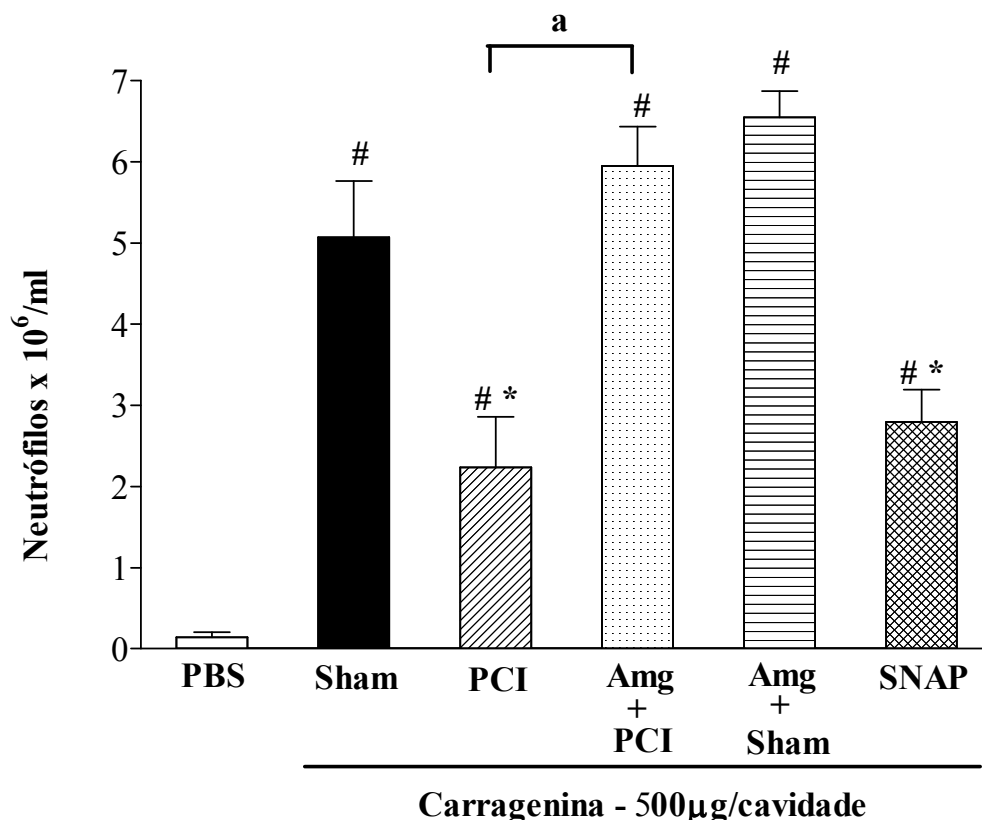


FIGURA 16 - Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; Amg: Aminoguanidina; SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina. Os resultados são expressos em média ± EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. (a) $p < 0,01$, comparação entre os grupos PCI e Amg+PCI. ANOVA – Teste de Tukey.

4.4 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

A administração de ODQ trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior bloqueou de forma significativa o efeito inibitório do PCI na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. A administração de ODQ trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Figura 17).

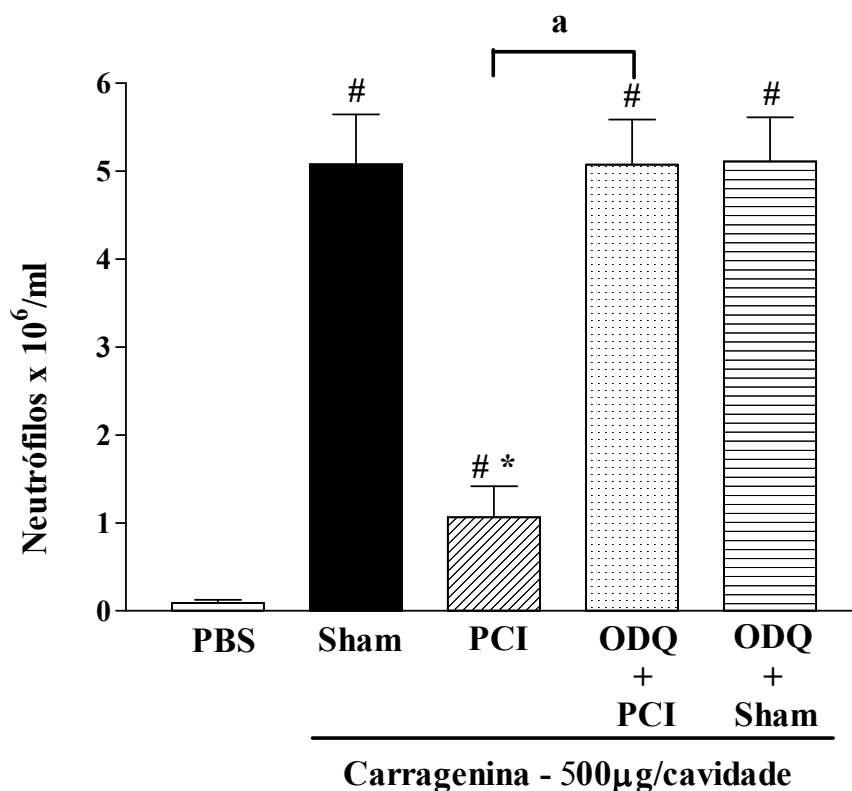


FIGURA 17 - Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; ODQ: 1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. (a) $p < 0,01$, comparação entre os grupos PCI e ODQ+PCI. ANOVA – Teste de Tukey.

4.5 Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos

Na Figura 18 observa-se que a administração de glibenclamida trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior não foi capaz de alterar o efeito inibitório do PCI na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. A administração de glibenclamida trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina.

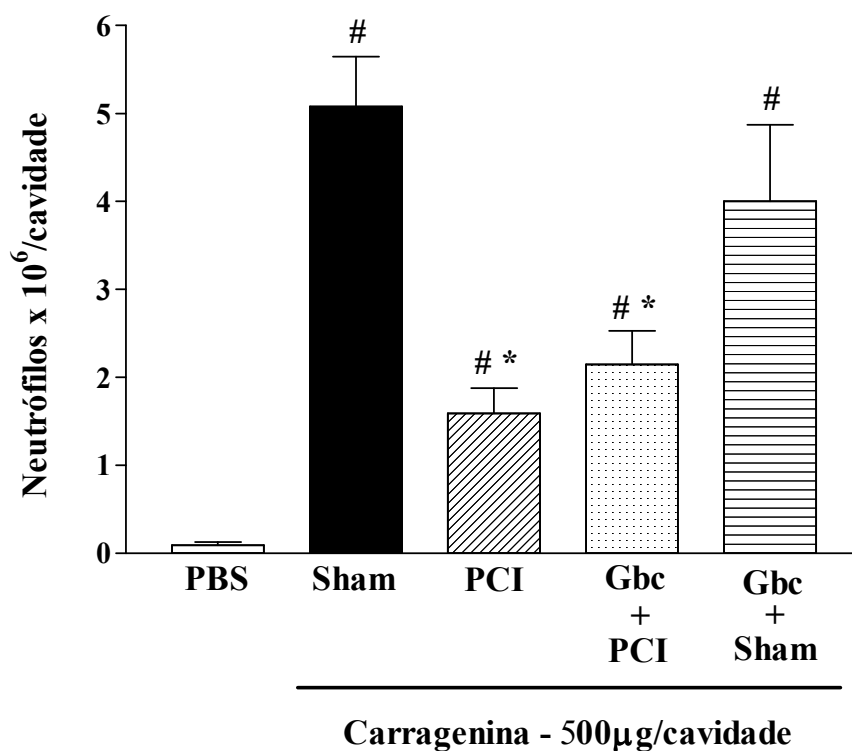


FIGURA 18 - Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; Gbc: Glibenclamida. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

4.6 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o rolamento, adesão leucocitária ao endotélio venular e migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos por carragenina em camundongos selvagens e NOSi-/-

Na Figura 19 observa-se que o PCI da pata posterior, quando realizado imediatamente antes da administração i.p. de carragenina, inibiu de forma significativa, em camundongos selvagens (NOSi +/+), o rolamento de leucócitos que ocorre 2 horas após a administração i.p. de carragenina (75,94%, $p < 0,01$), o mesmo não sendo observado nos animais NOSi -/-.

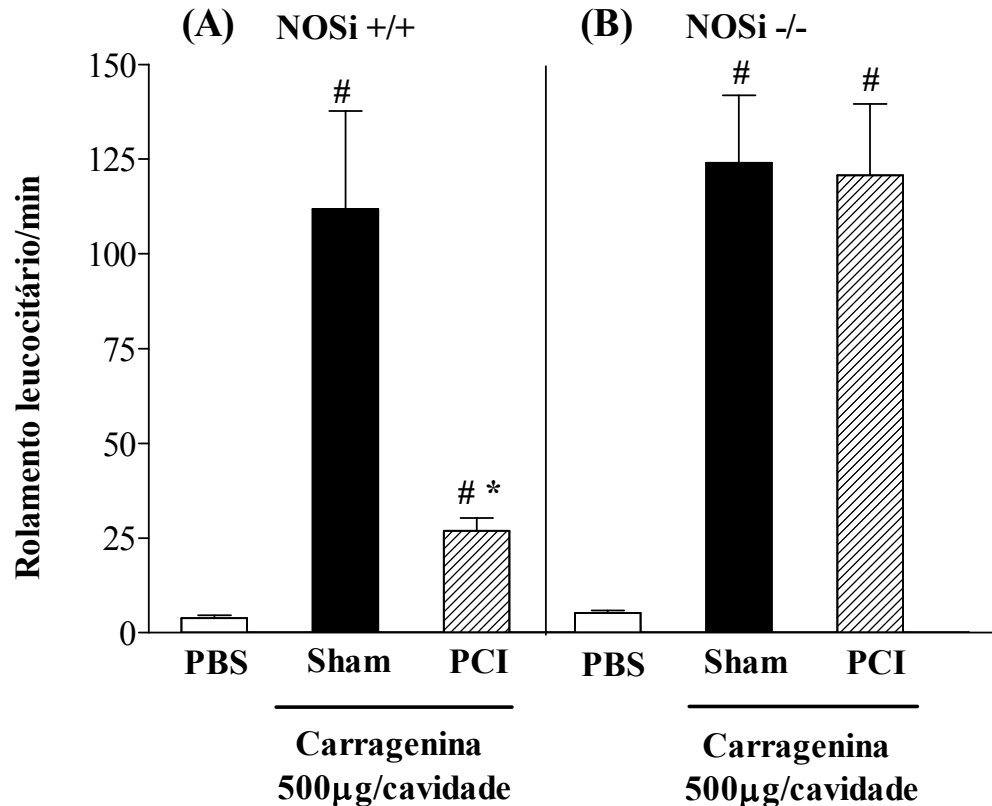


FIGURA 19 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre o rolamento leucocitário induzido por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; (A) NOSi +/+: Camundongos selvagens; (B) NOSi -/-: Camundongos com deleção gênica da NOSi. Os resultados são expressos em média \pm EPM de cinco animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

Na Figura 20 observa-se que o PCI da pata posterior, quando realizado imediatamente antes da administração i.p. de carragenina, inibiu de forma significativa, em camundongos selvagens (NOSi +/+), a adesão leucocitária ao endotélio venular que ocorre 4 horas após a administração i.p. de carragenina (56,51%, $p < 0,01$), o mesmo não sendo observado nos animais NOSi -/-.

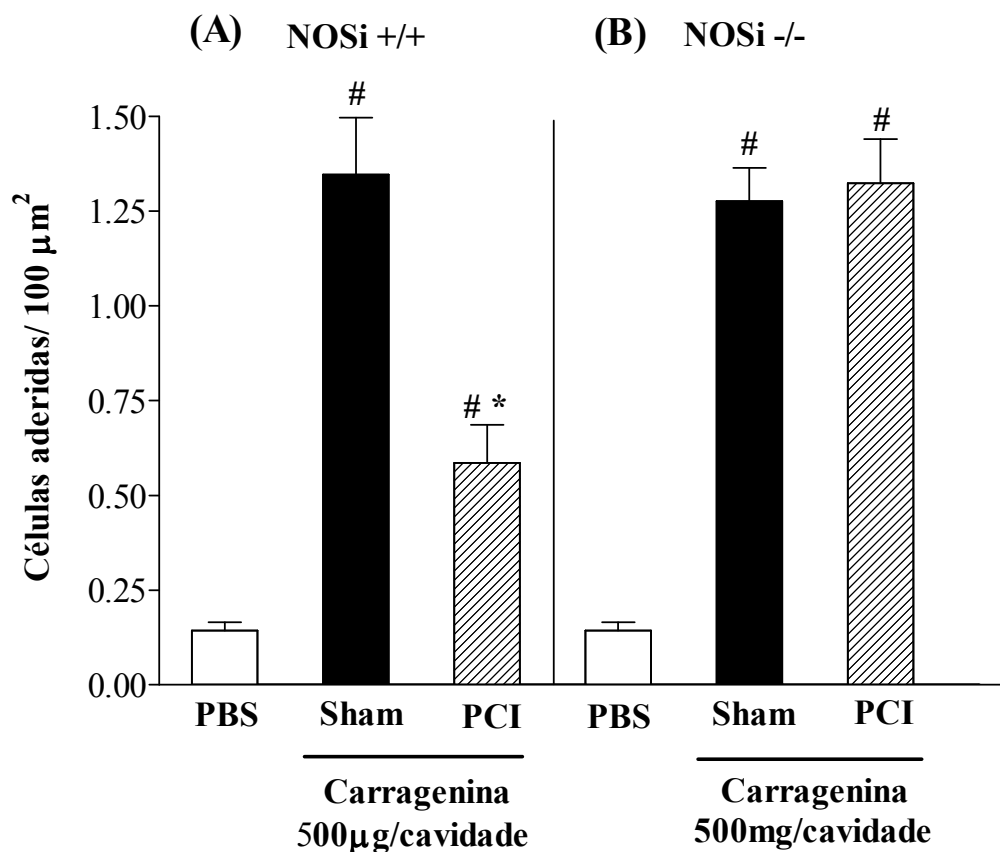


FIGURA 20 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a adesão leucocitária ao endotélio vascular induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi -/-. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; (A) NOSi +/+ : Camundongos selvagens; (B) NOSi -/-: Camundongos com deleção gênica da NOSi. Os resultados são expressos em média \pm EPM de cinco animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

Nas Figuras 21 e 22 observa-se que o PCI da pata posterior, quando realizado imediatamente antes da administração i.p. de carragenina, inibiu de forma significativa a migração de neutrófilos que ocorre 6 horas após a administração i.p. de carragenina em camundongos selvagens (NOSi +/+), o mesmo não sendo observado nos animais NOSi -/-.

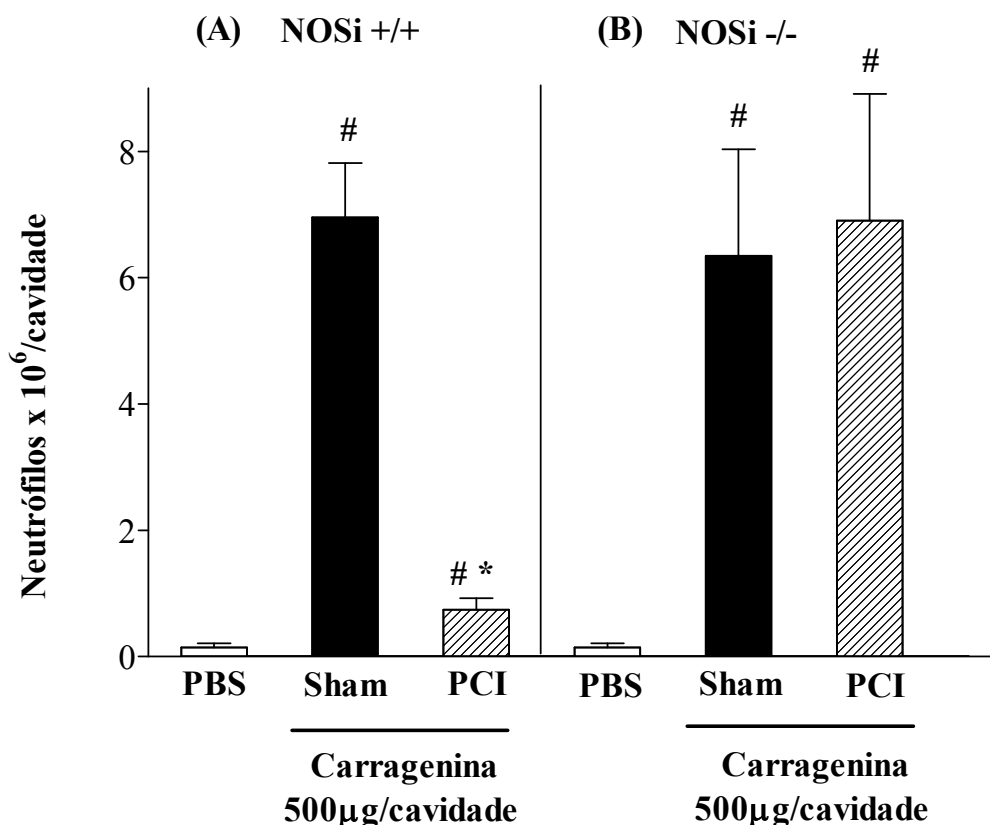


FIGURA 21 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOSi-/-. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; (A) NOSi +/+ : Camundongos selvagens; (B) NOSi -/-: Camundongos com deleção gênica da NOSi. Os resultados são expressos em média \pm EPM de cinco animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

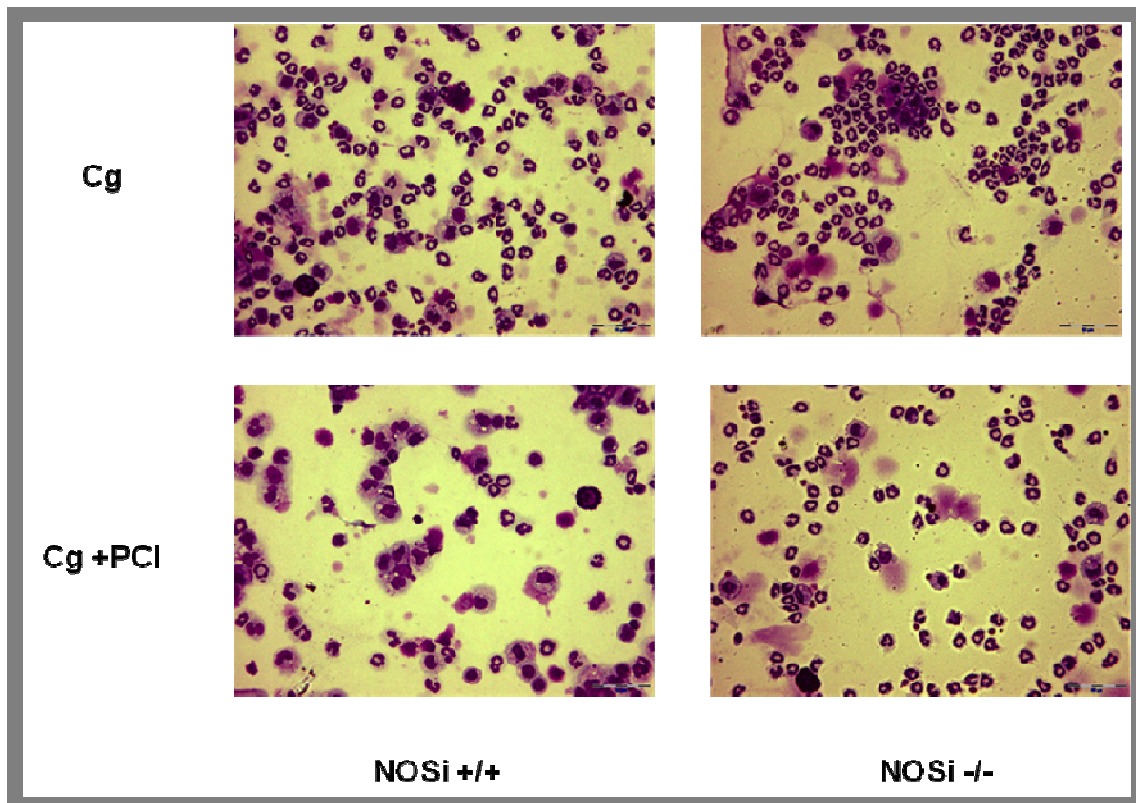


Figura 22 – Fotomicrografia representativa do efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens e NOS1^{-/-}. Cg: Carragenina; PCI: Pré-condicionamento isquêmico; NOS1^{+/+}: Camundongos selvagens; NOS1^{-/-}: Camundongos com deleção gênica da NOS1. (HE, 40x)

4.7 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal

O PCI da pata posterior, quando realizado imediatamente antes da administração i.p. de carragenina, não alterou de forma significativa a síntese e/ou liberação de TNF- α , IL-1 β e KC que ocorre 2 horas após a administração i.p. de carragenina (Figura 23).

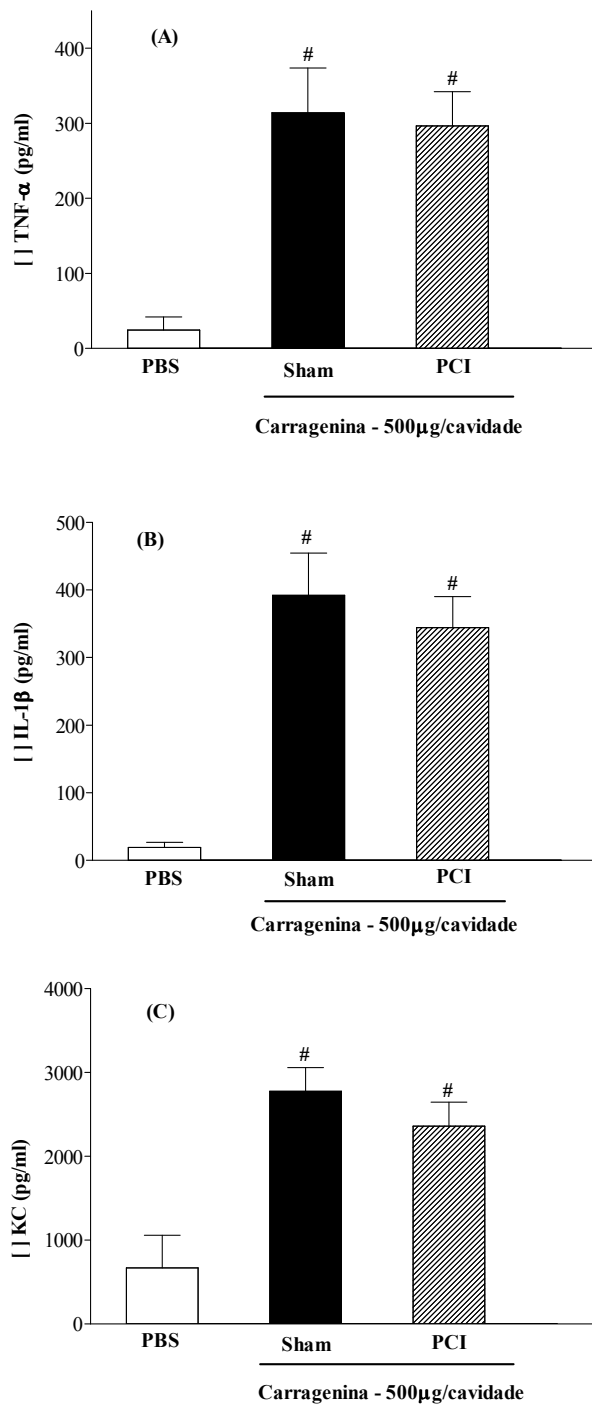


FIGURA 23 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e KC) induzidas por carragenina na cavidade peritoneal de camundongos selvagens. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; (A) TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa; (B) IL-1 β : Interleucina 1 beta; (C): KC: Quimiocina CXCL1. Os resultados são expressos em média \pm EPM de cinco animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo PBS. ANOVA – Teste de Tukey.

4.8 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos

Na Figura 24 observa-se que o PCI da pata posterior direita, quando realizado imediatamente antes da administração i.pl. de carragenina na pata posterior esquerda, inibiu de forma significativa a hipernociceção mecânica no seu pico, que ocorre 3 horas após a administração de carragenina (55%, $p < 0,01$), o mesmo não sendo observado quando salina foi administrada por via i.pl. na pata posterior direita dos ratos.

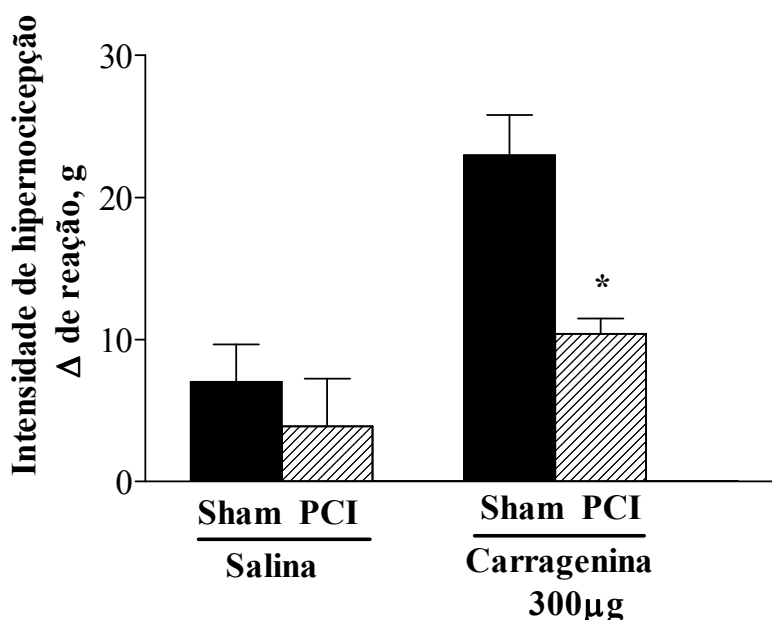


FIGURA 24 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela carragenina na pata contralateral de ratos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

4.9 Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

O PCI da pata posterior direita, quando realizado imediatamente antes da administração i.pl. de PGE₂ na pata posterior esquerda, inibiu de forma significativa a hipernociceção mecânica no seu pico, que ocorre 3 horas após a administração de PGE₂ (68%, $p < 0,01$), o mesmo não sendo observado quando salina foi administrada por via i.pl. na pata posterior direita dos ratos (Figura 25).

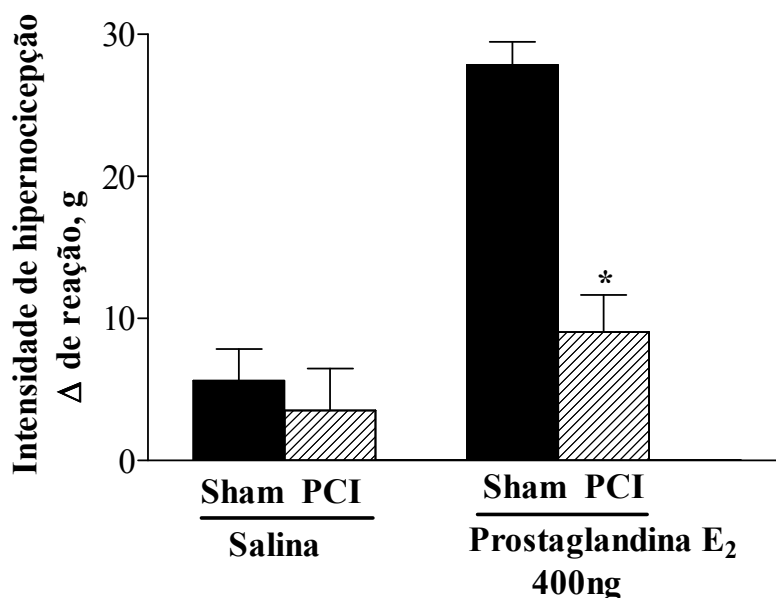


FIGURA 25 - Efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. ANOVA – Teste de Tukey.

4.10 Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

A administração i.pl. esquerda de LNMMA ou aminoguanidina trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior direita bloqueou de forma significativa o efeito inibitório do PCI na hipernocicepção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda. A administração i.pl. esquerda de LNMMA ou aminoguanidina trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a hipernocicepção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda (Figura 26).

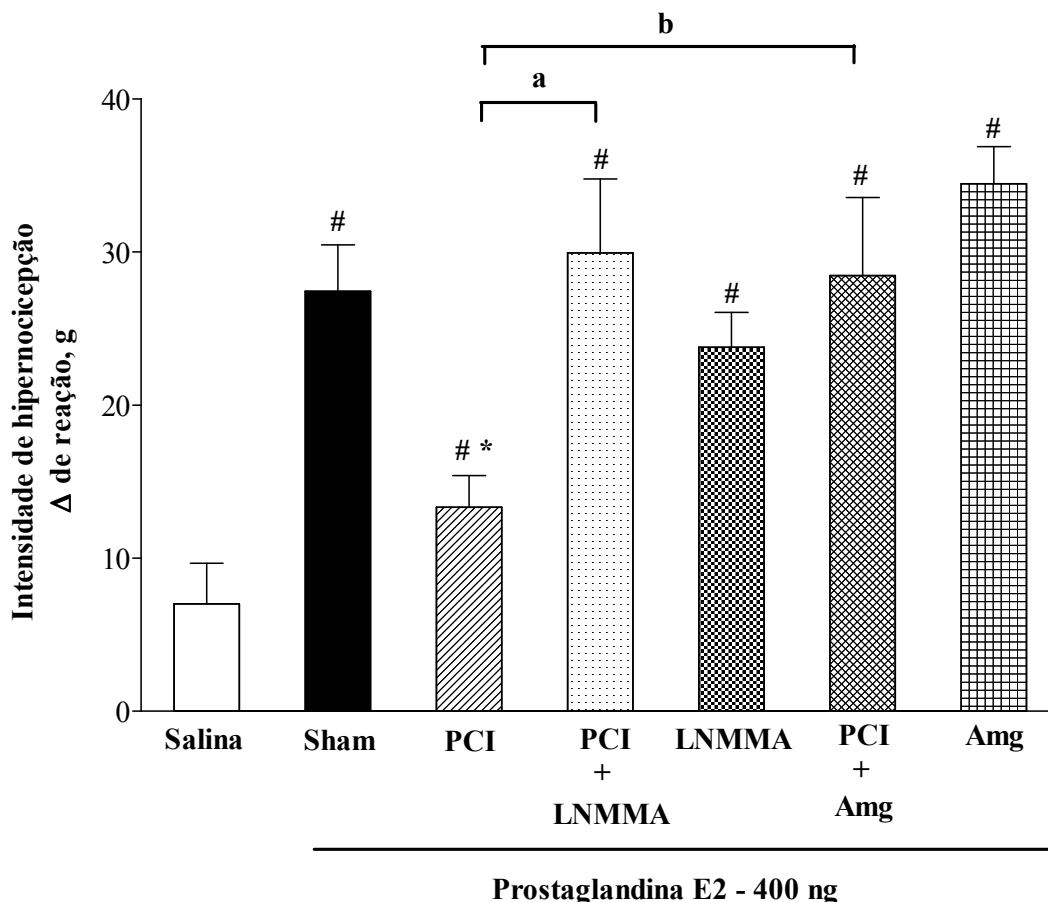


FIGURA 26 - Papel do NO no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; LNMMA: NG-Monometil-L-Arginina; Amg: Aminoguanidina. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Salina. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. (a) $p < 0,01$, comparação entre os grupos PCI e LNMMA+PCI. (b) $p < 0,01$, comparação entre os grupos PCI e Amg+PCI. ANOVA – Teste de Tukey.

4.11 Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

Na Figura 27 observa-se que a administração i.pl. esquerda de ODQ trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior direita bloqueou de forma significativa o efeito inibitório do PCI na hipernociceção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda. A administração i.pl. esquerda de ODQ trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a hipernociceção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda.

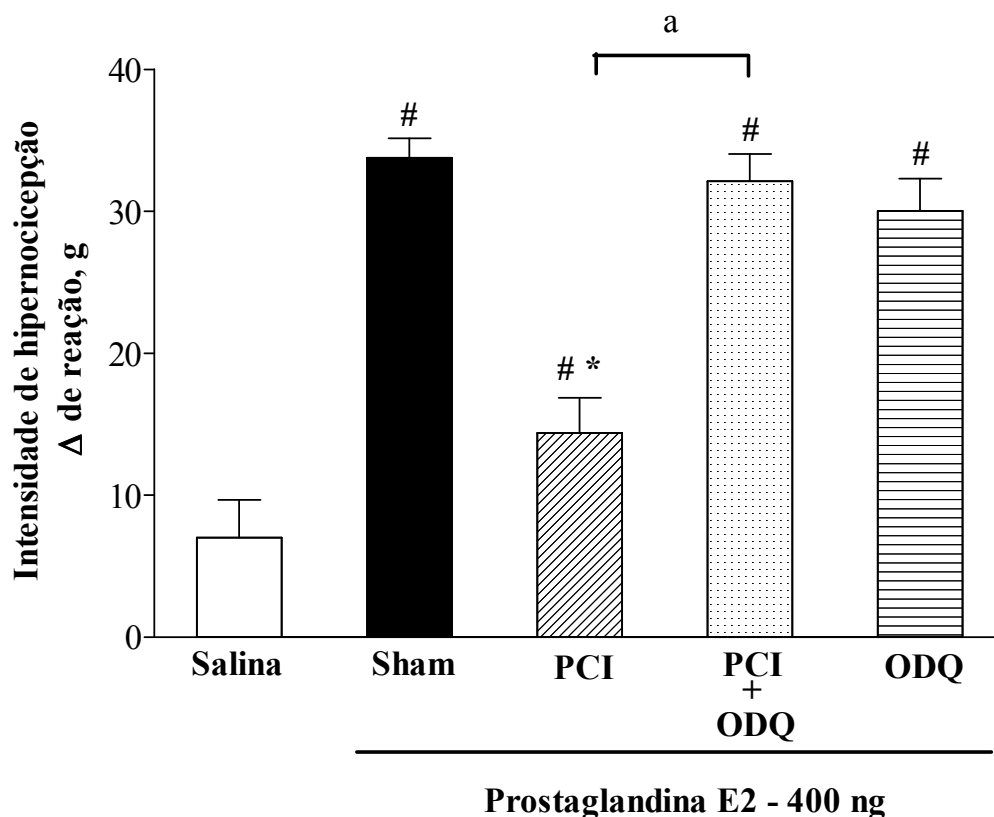


FIGURA 27 - Papel do GMPc no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; ODQ: 1H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3-a)quinoxalina-1-one. Os resultados são expressos em média ± EPM de seis animais por grupo. (#) p<0,01, em comparação com o grupo Salina. (*) p<0,01, em comparação com o grupo Sham. (a) p<0,01, comparação entre os grupos PCI e ODQ+PCI. ANOVA – Teste de Tukey.

4.12 Papel dos canais de K⁺_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ na pata contralateral de ratos

Na Figura 28 observa-se que a administração i.pl. esquerda de glibenclamida trinta minutos antes da indução do PCI da pata posterior direita bloqueou de forma significativa o efeito inibitório do PCI na hipernociceção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda. A administração i.pl. esquerda de glibenclamida trinta minutos antes do procedimento sham não alterou significativamente a hipernociceção mecânica induzida por PGE₂ na pata posterior esquerda.

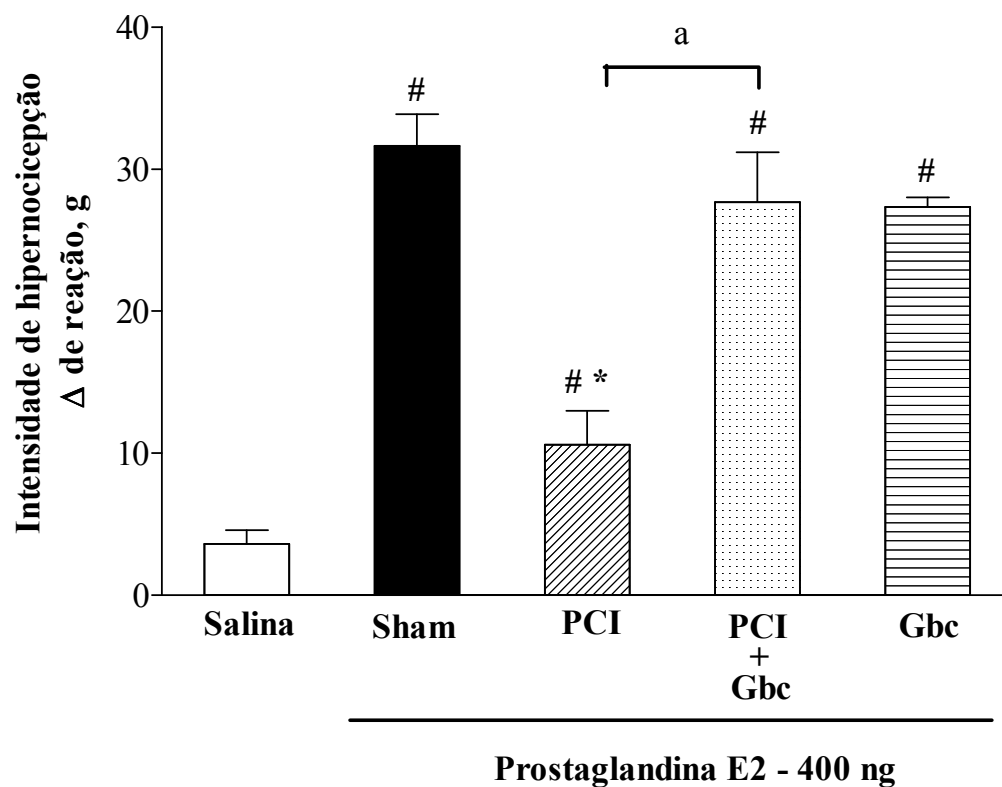


FIGURA 28 - Papel dos canais de K^+_{ATP} no efeito do Pré-condicionamento Isquêmico da pata posterior sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE_2 na pata contralateral de ratos. PCI: Pré-condicionamento isquêmico; Gbc: Glibenclamida. Os resultados são expressos em média \pm EPM de seis animais por grupo. (#) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Salina. (*) $p < 0,01$, em comparação com o grupo Sham. (a) $p < 0,01$, comparação entre os grupos PCI e Gbc+PCI. ANOVA – Teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que o PCI realizado na pata posterior de animais foi capaz de inibir eventos inflamatórios induzidos em sítios distantes, tais como a migração de neutrófilos em cavidades peritoneais e a hiperalgesia na pata contralateral.

Foi optado pela utilização do PCI na pata posterior de ratos como modelo experimental, uma vez que se trata de um procedimento de fácil execução, não invasivo e já utilizado com sucesso em outros estudos, inclusive os realizados na dissertação de Mestrado do autor (KÜNTSCHER et al., 2002a, 2002b, 2002c, SOUZA FILHO, 2005; SOUZA FILHO et al., 2009, 2010).

A escolha deste modelo também foi baseada em dados prévios da literatura que demonstram que a realização do PCI na pata posterior não proporciona nenhum dano significativo à função muscular dos animais, podendo inclusive proteger a musculatura esquelética dos efeitos lesivos de uma isquemia prolongada (GÜRKE et al., 1996; SAITO et al., 2004), significando que o PCI em si não é um fenômeno que induza uma agressão significativa. Küntscher et al. (2002b), utilizando um modelo de PCI com oclusão dos vasos femorais por 10 minutos, seguidos por 30 minutos de reperfusão, observaram uma melhora dos parâmetros da microcirculação em retalho muscular de cremaster, submetidos a 2 horas de isquemia, tanto quando o PCI era realizado na pata ipsilateral como na contralateral, significando que um ciclo de 10 minutos de isquemia e 30 de reperfusão é suficiente para se induzir o fenômeno do PCI na pata de animais.

O modelo de PCI na pata posterior de ratos utilizado no presente estudo, diferente de outros descritos, foi realizado com aplicação de um torniquete com faixa elástica na região proximal da pata. Quando se realiza o clampeamento direto dos vasos femorais, facilmente se observa a oclusão completa dos vasos pela ausência de fluxo distal ao clamp, bem como, quando se retira o clamp vascular se observa nitidamente a reperfusão pelo retorno do fluxo distal ao local onde se encontrava o clamp. Esta visualização direta dos vasos impede a inclusão no estudo de animais com isquemia incompleta ou não reperfusão por trombose dos vasos ou espasmos. Com a aplicação do torniquete não é possível a visualização direta dos vasos femorais. Para contornar esta dificuldade foi realizada a injeção endovenosa do corante azul de Evans logo após a aplicação do torniquete afim de se demonstrar que a isquemia da pata era completa, uma vez que o corante não se distribuía pela

pata com torniquete. Quando o torniquete era liberado, observava-se claramente a reperfusão pelo aparecimento do corante na pata antes isquêmica e sem corante.

Dado que a maioria dos insumos imunobiológicos utilizados em pesquisa básica envolvendo mecanismos de respostas imune-inflamatória estão disponíveis apenas para uso em camundongos, e, que animais geneticamente modificados para proteínas, enzimas e receptores envolvidos nas respostas imune-inflamatória também são obtidos a partir de cepas de camundongos, teve-se, ao iniciar este estudo, que reproduzir em camundongos o modelo de PCI remoto classicamente desenvolvido em ratos. Este foi o primeiro desafio ao se iniciar o estudo do efeito do PCI na inibição da migração de neutrófilos. De fato, foi possível reproduzir integralmente o modelo de PCI em camundongos Swiss e C57 black.

A técnica de extração de azul de Evans ora utilizada (GARCIA LEME; WILHELM, 1975) foi um método simples, prático e efetivo capaz de registrar claramente, e de forma inédita na literatura, a isquemia global e subsequente reperfusão do membro neste modelo de PCI, uma vez que a extração de azul de Evans foi significativamente menor na pata posterior direita durante a isquemia, sendo semelhante em ambas as patas após a liberação do torniquete e persistindo até 30 minutos.

Nossos resultados mostram que o PCI remoto inibe a migração de neutrófilos, visto que 10 minutos de isquemia da pata posterior, seguidos de 30 minutos de reperfusão, inibem significativamente o rolamento, adesão e migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos por carragenina. O efeito protetor do PCI local na infiltração de leucócitos durante a lesão de reperfusão tem sido relatado por vários autores (WANG et al., 1999; UNAL et al., 2003; SAITO et al., 2004). Eberlin et al. (2008) relataram recentemente que o PCI da pata posterior é capaz de proporcionar uma redução de 35% na lesão local na musculatura esquelética e 43% de redução na infiltração de neutrófilos para o pulmão. No presente trabalho foi observado que o pré-condicionamento isquêmico remoto induziu uma redução de 76% no rolamento de neutrófilos, 56% na adesão de leucócitos e 79% na migração de neutrófilos no modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina.

Apesar do papel do NO já estar bem estabelecido no PCI cardíaco direto, o seu papel no PCI remoto no coração, particularmente na fase precoce, é controverso. Neste sentido, o inibidor da NOS, N-omeganitro-L-arginine (L-NNA),

não conseguiu abolir a proteção induzida pelo PCI remoto na fase precoce da reperfusão após a lesão de isquemia-reperfusão cardíaca (PETRISHCHEV et al., 2001). Em outro estudo, após o PCI remoto, a inibição do NO bloqueou a proteção do endotélio cerebral na fase tardia (48 horas), mas não na fase inicial (15 min) da lesão de isquemia-reperfusão (VLASOV; KORZHEVSKIĬ; POLIAKOVA, 2004). No entanto, os resultados deste estudo necessitam de uma interpretação cautelosa, uma vez que um bloqueador não seletivo da síntese de NO (L-NNA) foi utilizado na fase inicial e um bloqueador relativamente seletivo da NOSi (sulfato metilisotiouréia-S) foi utilizado na fase tardia (VLASOV; KORZHEVSKIĬ; POLIAKOVA, 2004).

O NO é um mediador importante em outros órgãos e sistemas na fase precoce da lesão de reperfusão. Tem sido demonstrado que a inibição da síntese de NO suprime a proteção remota no pulmão (PERALTA et al., 1999). Da mesma forma, o antagonista inespecífico do NO, L-NAME suprime a proteção remota precoce no músculo cremastérico (KÜNTSCHER et al., 2002a) e nos retalhos epigástricos em ratos (KÜNTSCHER et al., 2003a). Kanoria et al. (2006) confirmaram que o PCI remoto da pata, realizado antes da lesão de isquemia-reperfusão hepática, está associada com um aumento significativo do nível plasmático arterial e hepático venoso de NO, com duas horas de reperfusão, quando comparado com animais que não foram condicionados. Estes estudos confirmam um importante papel do NO na fase inicial do PCI remoto. Entretanto, não há registros na literatura de estudos evidenciando o papel do NO no efeito inibitório do PCI remoto na migração de neutrófilos, em processos inflamatórios diversos da lesão de reperfusão.

No presente estudo, o pré-tratamento de camundongos do tipo selvagem com aminoguanidina, um inibidor seletivo da NOSi, reverteu completamente a inibição causada pelo PCI remoto na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. Além disso, a falha na inibição do PCI remoto, tanto no rolamento quanto na adesão e transmigração de neutrófilos, induzidos por carragenina, em camundongos com deleção gênica da NOSi, indica claramente que o NO está envolvido neste efeito protetor do PCI remoto. Estes dados estão em consonância com aqueles de Kanoria et al (2006) previamente relatados.

A capacidade do NO, derivado tanto da NOSi quanto da NOSe, em regular negativamente a migração de neutrófilos para um sítio inflamatório foi relatada por vários grupos (HICKEY E KUBES, 1997; DAL SECCO et al., 2003).

Desta forma, a administração de doadores de NO inibiu o rolamento, adesão e migração de neutrófilos induzidos por carragenina (IALENTI et al., 2000; DAL SECCO et al., 2006). Estes autores também mostraram que a inibição farmacológica tanto da NOSe quanto da NOSi, bem como a supressão do gene para NOSi, levava a um aumento nas interações leucócito-endotélio sendo que a maioria destes efeitos apresentados pelo NO pareciam ser mediados pelo GMPc, via ativação da GCs (IALENTI et al., 2000; DAL SECCO et al. 2003; AHLUWALIA et al., 2004; DAL SECCO et al., 2006). No presente estudo foi demonstrado que o ODQ, um inibidor da GCs, reverteu completamente o efeito inibitório do PCI remoto na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina, sugerindo fortemente que tal efeito protetor do PCI remoto ocorre através da ativação da via NOSi- NO- GCs- GMPc.

De há muito sabe-se que vários mediadores inflamatórios, como TNF α , IL-1 β e KC, participam ativamente do processo de migração dos leucócitos durante a inflamação (TESSIER et al., 1998; DANGERFIELD et al., 2005). Neste sentido, os resultados aqui apresentados mostraram que os níveis peritoneais de TNF α , IL-1 β e KC foram semelhantes entre os grupos de camundongos submetidos ou não ao PCI remoto e desafiados com a administração intraperitoneal de carragenina. Isto sugere que a diminuição da produção de citocinas quimiotáticas para os neutrófilos não parece estar envolvida no efeito inibitório do PCI remoto sobre o recrutamento de neutrófilos.

Por outro lado, observou-se que a inibição da migração de neutrófilos pelo PCI remoto foi acompanhada pela redução do rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas pós-capilares, quando se comparou animais tratados com carragenina e submetidos ou não ao PCI remoto, sugerindo que a redução da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais poderia ser um possível mecanismo envolvido neste efeito inibitório do PCI remoto. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado anteriormente, embora em um modelo "in vitro", que o condicionamento realizado em culturas de células endoteliais reduziu marcadamente o aumento da expressão da molécula de adesão endotelial intercelular tipo 1 (ICAM-1) e a adesão de neutrófilos às células endoteliais induzidas pelo ciclo anoxia/reoxigenação. (BEAUCHAMP et al., 1999) De qualquer forma, este dado, de fato reforça a postulada hipótese do envolvimento de moléculas de adesão

neste efeito do PCI remoto. Esta possibilidade está sendo explorada agora em outras pesquisas, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Dessa forma, dados preliminares com estes estudos mostraram que a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina não foi inibida pelo PCI da pata posterior (PCI remoto) em animais com deleção gênica da ICAM, sugerindo que esta proteína de adesão está fortemente envolvida neste efeito inibitório do PCI remoto. Além disso, os estudos com citometria de fluxo mostraram que o PCI da pata posterior induziu uma menor expressão de B2-Integrina (CD11b) em neutrófilos durante a resposta inflamatória induzida pela administração i.p. de carragenina. Assim, parece que o PCI realizado em um sítio distante é capaz de modular negativamente a expressão das proteínas de adesão ICAM-1 e B2-Integrina, podendo ser este evento um passo importante na inibição da migração de neutrófilos induzida pelo PCI remoto (SIMÃO, 2010).

A falha na inibição do rolamento, adesão e migração de neutrófilos induzidos por carragenina pelo PCI remoto em camundongos com deleção gênica da enzima NOSi, observada neste estudo, foi novamente coerente com os dados demonstrados anteriormente por Beauchamp et al. (1999) utilizando um modelo “in vitro” de anóxia/reoxigenação. Neste estudo o efeito inibitório do condicionamento sobre a expressão de ICAM-1 foi abolido pela adição do inibidor da NOS N^G-nitro-L-arginina (L-NA), na cultura de células endoteliais submetidas a ciclos de anóxia/reoxigenação. Dado que o efeito inibitório do NO na expressão de ICAM-1, in vivo, é mediado pela ativação da GCs (DAL SECCO et al., 2006), torna-se lícito especular, de forma racional, que o efeito inibitório do PCI remoto sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, presente neste estudo, possa ser devido a redução na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais através da ativação da via NOSi- NO- GCs- GMPc.

Os mecanismos moleculares envolvidos no pré-condicionamento ainda estão sendo estudados, mas parece que na maioria dos casos o passo final comum é a abertura dos canais de K⁺_{ATP} (GROSS; PEART, 2003). Os resultados de estudos recentes indicam que o PCI pode aumentar a atividade dos canais de K⁺_{ATP} e atenuar a lesão de reperfusão do miocárdio através deste mecanismo (MA et al., 2004; RAJESH et al., 2004). Além disso, Moses et al. (2005a, 2005b) mostraram que os canais mK⁺_{ATP} desempenham um papel central no mecanismo de gatilho, bem

como um importante papel como mediador, na redução do infarto do músculo esquelético do *latissimus dorsi* induzida pelo PCI remoto na pata de porcos. Segundo Moses et al. (2005a, 2005b) a abertura de canais mK_{ATP}^+ no músculo esquelético isquêmico está associado a um efeito poupador de ATP durante a isquemia prolongada, bem como a uma atenuação no acúmulo de neutrófilos durante a reperfusão. Os resultados aqui apresentados estão em contraste com este último estudo, uma vez que a glibenclamida, um bloqueador dos canais K_{ATP}^+ , não foi capaz de inibir o efeito do PCI remoto na migração de neutrófilos induzida por carragenina. No entanto, os estudos que demonstram o efeito protetor dos canais de K_{ATP}^+ avaliaram o efeito do PCI remoto em células musculares miocárdicas ou esqueléticas (MA et al., 2004; MOSES et al., 2005a, 2005b; RAJESH et al., 2004). É possível que o efeito protetor relacionado a abertura do canal K_{ATP}^+ com o pré-condicionamento que está citado nos trabalhos acima esteja relacionado a reperfusão das células musculares. No presente estudo, o modelo utilizado para se avaliar o efeito protetor do PCI remoto não foi um modelo de LR e sim o modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina. Além disso, a cavidade peritoneal apresenta um território vascular distinto, onde os efeitos protetores dos canais de K_{ATP}^+ nas células deste tecido podem não ser relevantes para a migração de neutrófilos.

Em resumo, o presente estudo demonstra, de forma inédita, que o PCI remoto da pata inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade peritoneal, através de mecanismos que podem ser dependente da ativação da GCs. De forma importante também foi demonstrado que a ativação da NOS está envolvida no efeito inibitório do PCI remoto sobre a migração de neutrófilos para o foco inflamatório. A abertura dos canais K_{ATP}^+ , possivelmente, não está envolvida neste efeito protetor do PCI remoto (Figura 29). Os resultados sugerem que o PCI remoto poderia ser uma ferramenta terapêutica potencial em diversas doenças inflamatórias clinicamente relevantes em que as lesões de tecidos envolvem o recrutamento de neutrófilos.

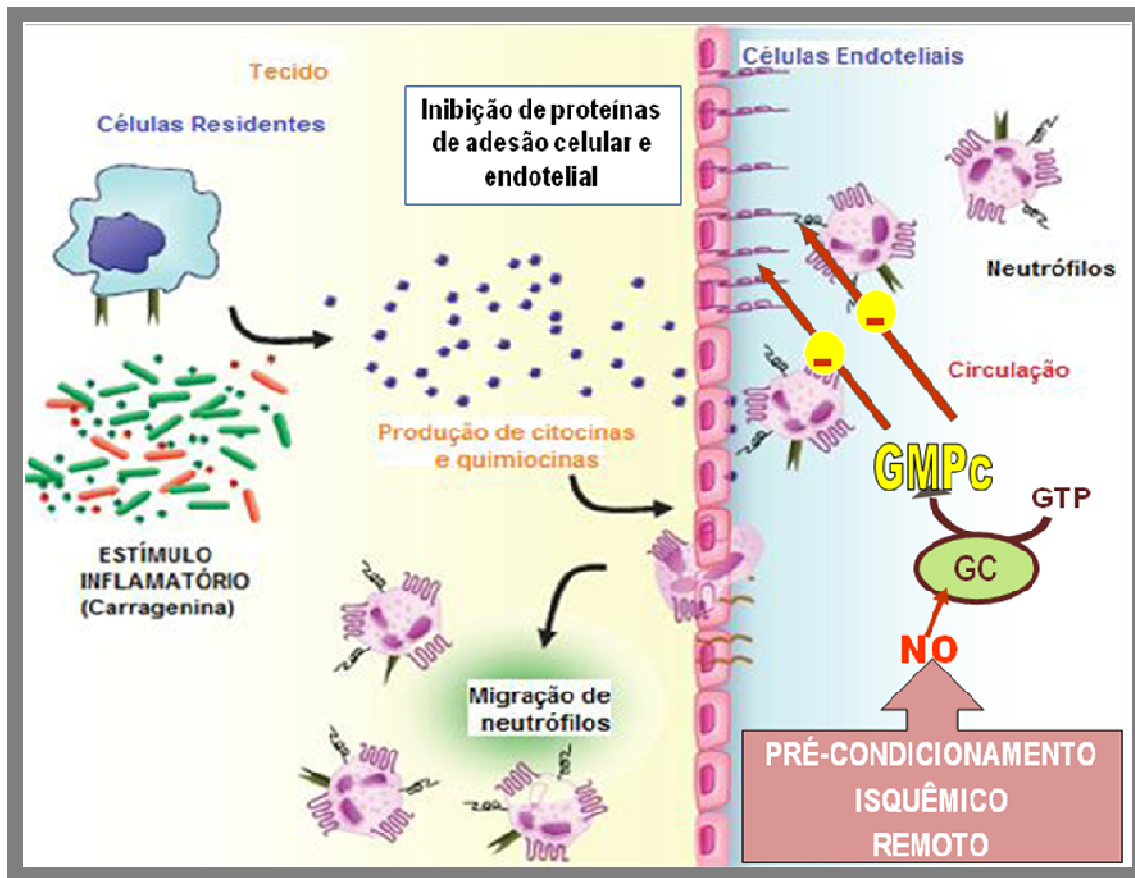


FIGURA 29 - Esquema ilustrativo do mecanismo hipotético proposto para o efeito do Pré-condicionamento isquêmico remoto na inibição da migração de neutrófilos.

Fonte: Adaptado de ALVES-FILHO et al., 2008.

Apesar do efeito protetor do PCI remoto tanto nas lesões de isquemia-reperfusão, quanto em diversas outras lesões inflamatórias, já estar bem estabelecido, não existe nenhum relato na literatura avaliando diretamente o efeito do PCI remoto na dor inflamatória. No único estudo que avalia dor e PCI, Orban et al. (2006) avaliam o efeito do PCI local, e não remoto, no consumo pós-operatório de analgésico. Neste estudo os pacientes submetidos a ligamentoplastia artroscópica de joelho apresentaram um consumo menor de morfina nas primeiras 48 horas de pós-operatório quando eram submetidos ao PCI local com 5 minutos de isquemia, seguidos de 10 minutos de reperfusão, imediatamente antes da realização do procedimento cirúrgico. Vale ressaltar que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos níveis séricos de mioglobina e creatinina fosfoquinase (CPK), demonstrando que a taxa de rabdomiólise era semelhante nos dois grupos.

Os resultados aqui apresentados mostram que o PCI remoto reduziu de forma intensa o efeito hipernociceptivo tanto da carragenina quanto da

prostaglandina E₂, demonstrando que o PCI remoto apresenta um efeito inibitório na dor inflamatória não somente por diminuir a intensidade do processo inflamatório, mas também por inibir diretamente a hipernocicepção induzida pela prostaglandina E₂, que se constitui um dos principais indutores diretos do processo de dor inflamatória.

Neste contexto, os resultados apresentados no presente estudo mostraram que o PCI da pata contralateral foi capaz de reduzir em 55% a hipernocicepção induzida por carragenina e em 68% a hipernocicepção induzida por prostaglandina E₂. Orban et al. (2006) conseguiram uma redução de 53% no consumo de morfina no pós-operatório de ligamentoplastia artroscópica de joelho quando realizava o PCI no mesmo membro. Apesar do modelo experimental diferente, além do fato de que Orban et al. (2006) avaliaram o efeito do PCI local e não remoto, pode-se observar que a intensidade da inibição da dor inflamatória foi muito semelhante. Entretanto quando se avalia diretamente a hipernocicepção com a administração intraplantar de prostaglandina E₂, observa-se que o efeito inibitório é mais intenso quando comparado ao efeito no consumo pós-operatório de morfina do estudo de Orban et al. (2006) (68% x 53%) e quando contrastado com a hipernocicepção induzida por carragenina (68% x 55%).

Como já relatado anteriormente, o papel do NO no PCI é controverso. Entretanto diversos estudos, inclusive os anteriormente aqui apresentados, apontam para um importante papel do NO no efeito protetor do PCI (KANORIA et al., 2007). Na musculatura esquelética, intestino, cérebro e coração foram bem demonstrados o papel do NO no PCI-r (KÜNTSCHER et al. 2002a, 2002b, 2002c, 2003a, 2003b; WANG et al., 2001; VLASOV; KORZHEVSKIĬ; POLIAKOVA, 2004; TOKUNO et al., 2002). Estes estudos mostraram que o PCI remoto da pata posterior induziu proteção em retalhos musculares na fase precoce e tardia do PCI remoto, sendo este efeito abolido pelo bloqueio não seletivo da síntese de NO com L-NG-Nitroarginina metil ester (L-NAME) (KÜNTSCHER et al. 2002a, 2002b, 2002c, 2003a, 2003b). Wang et al. (2001) relataram a indução da NOS_i miocárdica após PCI remoto mesentérico com diminuição da área de infarto miocárdico. Tokuno et al. (2002) mostraram que efeito protetor do PCI remoto cerebral sobre a lesão de isquemia-reperfusão cardíaca está ausente em camundongos NOS_i^{-/-}.

No presente trabalho demonstramos que o efeito antinociceptivo do PCI remoto parece estar relacionado com a ativação da NOS, uma vez que o pré-

tratamento dos animais tanto com um inibidor não-seletivo da NOS (L-NMMA) quanto com um inibidor seletivo da NOSi (aminoguanidina) foi capaz de reduzir significativamente o efeito antinociceptivo do PCI remoto na hipernocicepção plantar induzida por PGE₂. Além disso foi observado neste protocolo experimental que a administração isolada destes inibidores da NOS, 70 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (30 minutos antes do procedimento sham), não foi capaz de alterar significativamente o efeito hipernociceptivo da PGE₂ em animais que não foram submetidos ao PCI remoto, demonstrando um efeito específico dos inibidores da NOS no efeito do PCI remoto e não no efeito hipernociceptivo direto da PGE₂.

Apesar dos relatos controversos encontrados na literatura para o efeito periférico do NO na dor inflamatória, a possibilidade do efeito antinociceptivo do PCI remoto ser mediado pelo NO está de acordo com os estudos que relataram que a administração periférica de doadores de NO como nitroprussiato de sódio (200-500 µg) (DUARTE et al., 1990), SIN-1 (50-100 µg) (FERREIRA et al., 1991) ou SNAP (50-200 µg) (CUNHA et al., 1999) por via intraplantar reduziram a hipernocicepção induzida por PGE₂ no teste de pressão plantar em ratos. Assim, o PCI remoto na pata posterior poderia estar induzindo a produção de NO via ativação da enzima NOSi, o qual, tendo um efeito antinociceptivo, estaria inibindo a dor inflamatória.

Assim como ocorre para a migração de neutrófilos, o efeito inibitório do NO na dor inflamatória também parece ocorrer via ativação da GCs, com conseqüente produção de GMPc. Sachs, Cunha e Ferreira (2004) haviam demonstrado que o efeito antinociceptivo da dipirona na hipernocicepção induzida por PGE₂ é revertido pelo pré-tratamento dos animais com ODQ, um inibidor da GCs. Da mesma forma, em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que o efeito antinociceptivo da toxina pertussis na hipernocicepção induzida por PGE₂ ocorre via ativação da NOS, produção de NO e ativação da GCs (BRITO et al., 2006). Mais recentemente, Vale et al. (2007) relataram que o efeito do sildenafil (inibidor da fosfodiesterase do GMPc) na inibição da hipernocicepção induzida por zimosan, no modelo de contorções abdominais, é revertido tanto pelo pré-tratamento dos animais com inibidores da NOS quanto por inibidores da GCs, como o ODQ.

No presente estudo foi avaliado se o efeito do PCI remoto na inibição da dor inflamatória ocorria via ativação da GCs. Observou-se que o pré-tratamento dos animais com ODQ, 30 minutos antes da indução do PCI remoto na pata contralateral, inibia significativamente o efeito do PCI remoto sobre a

hipernocicepção plantar induzida por PGE_2 na pata contralateral. A administração isolada de ODQ, 70 minutos antes do estímulo hipernociceptivo, não modificou a intensidade da hipernocicepção. Assim, a ativação da GCs, com conseqüente produção de GMPc, provavelmente está envolvida neste efeito protetor do PCI remoto.

Na literatura encontra-se registrado que a abertura dos canais K^+_{ATP} mitocondriais (mK^+_{ATP}) parece ser decisiva em todos os modelos de PCI. Embora tanto os canais K^+_{ATP} sarcolemiais (sK^+_{ATP}) quanto mitocondriais pareçam estar envolvidos, são os canais mitocondriais que representam condição sine qua non para o efeito do condicionamento (O'ROURKE, 2004). Desta forma, a administração de Glibenclamida (bloqueador não seletivo de canais K^+_{ATP}) e 5-Hidrodecanoato (5-HD - inibidor seletivo de canais mK^+_{ATP}) bloquearam o efeito de cardioproteção que ocorre após o PCI remoto do pata posterior de ratos, mas a inibição seletiva dos canais sK^+_{ATP} com HMR 1098 falhou em bloquear esta proteção (TAKAOKA et al., 1999; WANG et al., 2002; KRISTIANSEN et al., 2005), reforçando a idéia de que a abertura dos canais mK^+_{ATP} parece ser decisiva no efeito protetor do PCI.

Em outro relato demonstrou-se que a administração de um agente específico em abrir canais mK^+_{ATP} , BMS191095, antes da isquemia prolongada, teve um efeito protetor semelhante ao PCI remoto. A administração do 5-HD antes do BMS191095 aboliu seu efeito protetor. (MOSES et al., 2005a, 2005b). Isso foi posteriormente confirmado no modelo de transplante cardíaco onde o efeito cardioprotetor do PCI remoto da pata posterior foi abolido pela glibenclamida (KONSTANTINOV et al, 2005b). A glibenclamida aboliu ainda o efeito benéfico do efluente coronariano obtido de corações de coelhos condicionados e transferidos para outros animais submetidos posteriormente a uma lesão de isquemia-reperfusão intestinal, reforçando o papel dos canais K^+_{ATP} na proteção remota de outros órgãos. (DICKSON et. al, 2002)

O exato mecanismo molecular pelo qual a abertura dos canais K^+_{ATP} promove esta proteção é desconhecido. É provável que a abertura dos canais K^+_{ATP} nos órgãos-alvo antes ou imediatamente após a isquemia prolongada conseqüente a isquemia transitória da pata reduza a taxa de hidrólise de ATP (DOS SANTOS et al., 2002) ou a atividade da ATPase mitocondrial (VANDER HEIDE et al., 1996;

VUORINEN et al., 1995), diminuindo assim a taxa de depleção de ATP durante a reperfusão.

O efeito antinociceptivo do NO e do GMPc parece ocorrer via abertura dos canais K^+_{ATP} , sendo relatado que diversas substâncias com efeito analgésico atuam através desta via. Duarte e colaboradores (RODRIGUES; DUARTE, 2000; SOARES et al., 2000; SOARES; DUARTE, 2001; ALVES; DUARTE, 2002) observaram que o bloqueio da hipernocicepção induzida por PGE_2 pela morfina, dipirona, nitroprussiato de sódio, e butiril-GMPc é antagonizado por inibidores específicos de canais K^+_{ATP} como glibenclamida e tolbutamida. Assim, analgésicos de ação periférica direta parecem agir restabelecendo a normalidade do limiar dos nociceptores através do aumento da permeabilidade ao potássio.

Sabe-se que, dependendo do sistema biológico, o GMPc modula diretamente os canais iônicos (GREGER; WINDHORST, 1996) ou atua indiretamente, via estimulação da proteína quinase G (PKG) e conseqüente abertura dos canais de K^+_{ATP} (HAN et al., 2001; HAN et al., 2002; SEGAWA et al., 2001). Sachs, Cunha e Ferreira (2004) demonstraram que a ativação da PKG pelo GMPc é necessária para a abertura dos canais K^+_{ATP} e produção de analgesia. Assim, no presente estudo foi avaliado se o efeito antinociceptivo do PCI remoto na hipernocicepção plantar dependia, além da ativação da NOS e GCs, da abertura dos canais K^+_{ATP} . Observou-se que o pré-tratamento dos animais com glibenclamida, 30 minutos antes da indução do PCI-r na pata contralateral, inibia significativamente o efeito do PCI-r sobre a hipernocicepção plantar induzida por PGE_2 na pata contralateral, enquanto a administração apenas da glibenclamida, 70 minutos antes do estímulo hipernociceptivo, não alterava a intensidade da hipernocicepção. Assim, podemos sugerir que o efeito antinociceptivo do PCI remoto ocorre através da via L-Arginina-NO-GCs-GMPc- K^+_{ATP} (Figura 30).

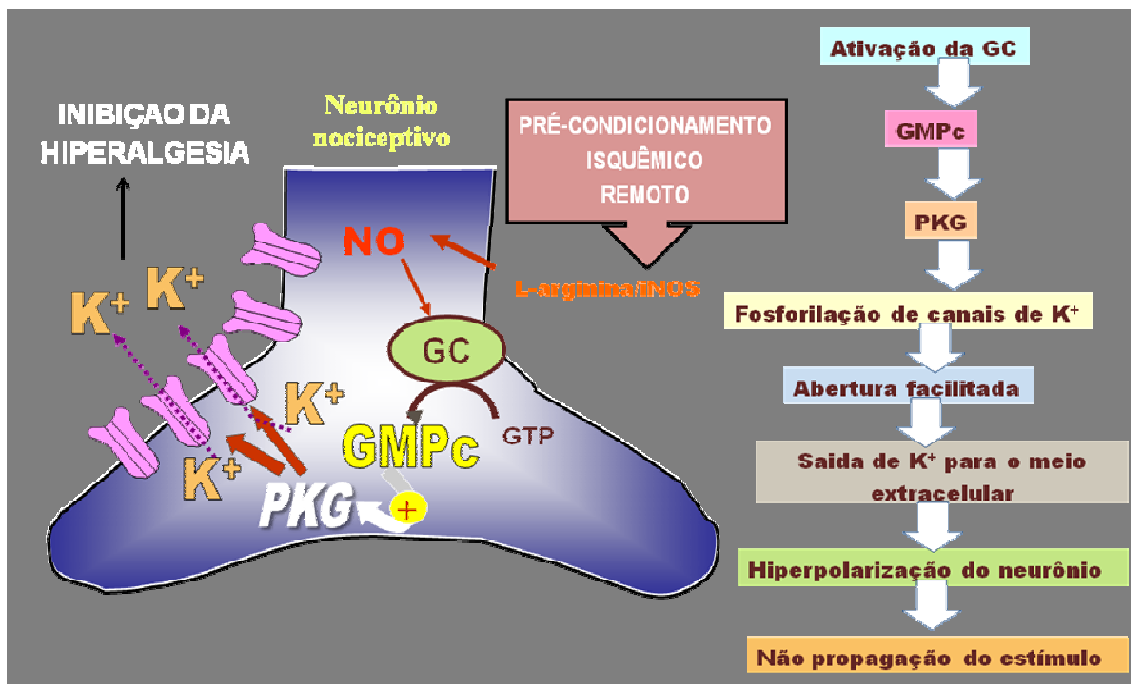


FIGURA 30 - Esquema ilustrativo do mecanismo hipotético proposto para o efeito antinociceptivo do Pré-condicionamento isquêmico remoto.

A possibilidade de modulação da dor inflamatória através de um procedimento não invasivo como o PCI remoto pode ser importante em diversas situações clínicas relevantes. Particularmente o PCI remoto pode ser benéfico no controle da dor pós-operatória, uma vez que, podendo ser realizado em um sítio diferente daquele onde será realizado o procedimento cirúrgico, não prolongaria o tempo operatório, aumentando assim a aceitabilidade do método pelos profissionais envolvidos no procedimento. A realização do PCI remoto poderia reduzir de forma significativa o consumo de analgésicos, diminuindo assim a possibilidade de aparecimento de efeitos adversos associados a estas drogas.

Diversos estudos ainda necessitam ser realizados para se melhor avaliar qual via estaria envolvida neste efeito do PCI remoto, em particular se seria uma via neuronal ou uma via hematogênica. A possibilidade de outras substâncias estarem envolvidas no efeito antinociceptivo do PCI remoto também necessita de avaliação futura. Diversos estudos já estão em andamento e acreditamos que, por ser este efeito do PCI remoto inédito na literatura, a divulgação deste trabalho poderá trazer importante contribuição para o desenvolvimento de estudos científicos futuros.

6 CONCLUSÕES

6.1 O Pré-condicionamento Isquêmico remoto inibe o rolamento leucocitário, adesão ao endotélio venular e a migração de neutrófilos, *in vivo*, durante a resposta inflamatória à distância

6.2 O Pré-condicionamento Isquêmico remoto inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina para cavidade peritoneal através da via L-Arginina-NO-GMPc. Os canais de potássio sensíveis ao ATP parecem não estar envolvidos no efeito inibitório do Pré-condicionamento Isquêmico remoto na inibição da migração de neutrófilos, *in vivo*, durante a resposta inflamatória à distância.

6.3 O Pré-condicionamento Isquêmico remoto não altera a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por carragenina em cavidade peritoneal.

6.4 O Pré-condicionamento Isquêmico remoto inibe a hipernocicepção mecânica induzida tanto por carragenina quanto por PGE₂ na pata contralateral durante a resposta inflamatória.

6.5 O Pré-condicionamento Isquêmico remoto inibe a hipernocicepção mecânica induzida por PGE₂ na pata contralateral através da via L-Arginina-NO-GMPc-canais de potássio sensíveis ao ATP.

7 REFERÊNCIAS

ADDISON, P.D.; NELIGAN, P.C.; ASHRAFPOUR, H.; KHAN, A.; ZHONG, A.; MOSES, M.; FORREST, C.R.; PANG, C.Y. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 285, n. 4, p. H1435-1443, 2003.

AGUIRRE-BANUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 42, n. 2, p. 79-85, 1999.

AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R. S.; MCLEAN, P. G.; MATHUR, A.; PERRETTI, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J.. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 101, n. 5, p. 1386-1391, 2004.

AHUJA, S. K.; MURPHY, P. M. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 34, p. 20545-20550, 1996.

AJUEBOR, M. N.; VIRAG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology*, v. 95, n. 4, p. 625-630, 1998.

AKOPIAN, A.N.; SOUSLOVA, V.; ENGLAND, S.; OKUSE, K.; OGATA, N.; URE, J.; SMITH, A.; KERR, B.J.; MCMAHON, S.B.; BOYCE, S.; HILL, R.; STANFA, L.C.; DICKENSON, A.H.; WOOD, J.N. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat. Neurosci.*, v. 2, n. 6, p. 541-548, 1999.

AKSÖYEK, S.; CINEL, I.; AVLAN, D.; CINEL, L.; OZTÜRC, C.; GÜRBÜZ, P.; NAYCI, A.; ORAL, U. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock*, v. 18, n. 5, p. 476-480, 2002.

ALCINDOR, D.; KROLIKOWSKI, J. G.; PAGEL, P. S.; WARLTIER, D. C.; KERSTEN, J. R. Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. *Anesthesiology*, v. 100, n. 3, p. 547-554, 2004.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J. Neurosci.*, v. 19, n. 6, p. 2181-2186, 1999.

ALEY, K.O.; MCCARTER, J.D.; LEVINE, J.D. Nitric oxide signalling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, v. 18, n. 17, p. 7008–7014, 1998.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, 2002.

ALVES-FILHO, J.C; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*, v. 30, p. 3-9, 2008.

AMAYA, F.; WANG, H.; COSTIGAN, M.; ALLCHORNE, A.J.; HATCHER, J.P.; EGERTON, J.; STEAN, T.; MORISSET, V.; GROSE, D.; GUNTHORPE, M.J.; CHESSELL, I.P.; TATE, S.; GREEN, P.J.; WOOLF, C.J. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.*, v. 26, n. 50, p. 12852-12860, 2006.

ANTELMÍ, I.; KALIL, R.; LOPES, N. H.; FORLENZA, L. M.; BARDUCO, M. S.; PIVA DE ALBUQUERQUE, C.; TRANCHES, B.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Evaluation of ischemic preconditioning on collateral circulation, ventricular function and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 66, n. 1, p.11-14, 1996.

BABBEDGE, R.C.; HART, S.L.; MOORE, P.K. Anti-nociceptive activity of nitric oxide synthase inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 45, n. 1, p. 77–79, 1993.

BAEZ, S. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. *Circ. Res.*, v. 25, n. 3, p. 315-329, 1969.

BARTHEL, S. R.; JOHANSSON, M. W.; MCNAMEE, D. M.; MOSHER. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J. Leukoc. Biol.*, v. 83, n. 1, p. 1-12, 2008.

BEAUCHAMP, P.; RICHARD, V.; TAMION, F.; LALLEMAND, F.; LEBRETON, J.P.; VAUDRY, H.; DAVEAU, M.; THUILLEZ C. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation*, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1999.

BELLAVITE, P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 4, n. 4, p. 225-261, 1988.

BELOSJOROW, S.; BOLLE, I.; DUSCHIN, A.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. TNF-alfa antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 284, n. 3, p.927-930, 2003.

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.*, v. 182, n. 1, p. 214-223, 2000.

BERRAZUETA, J.R.; FLEITAS, M.; SALAS, E.; AMADO, J.A.; POVEDA, J.J.; OCHOTECO, A.; SÁNCHEZ DE VEGA, M.J.; RUIZ DE CELIS, G. Local transdermal glyceryl trinitrate has an antiinflammatory action on thrombophlebitis induced by sclerosis of leg varicose vein. *Angiology*, v. 45, n. 5, p. 347-351, 1994.

BERRAZUETA, J.R.; LOSADA, A.; POVEDA, J.; OCHOTECO, A.; Riestra, A.; SALAS, E.; AMADO, J.A. Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. *Pain*, v. 66, n. 1, p. 63-67. 1995.

BESSION, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, v. 67, p. 67-186, 1987.

BINDER, R.; KRESS, A.; KIRSCHFINK, M. Modulation of C5a-mediated effector functions of human polymorphonuclear leukocytes by tumor necrosis factor alpha and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Exp. Clin. Immunogenet.*, v. 16, n. 4, p. 212-225, 1999.

BIRNBAUM, Y.; HALE, S.L.; KLONER, R.A. Ischemic preconditioning at a distance: Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*, v. 96, n. 5, p. 1641-1646, 1997.

BOLLI, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 33, p. 1897-1918, 2001.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, v. 89, n.10, p. 3503-3521, 1997.

BREDT, D. S.; GLATT, C. E.; HWANG, P. M.; FOTUHI, M.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in

neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.*, v. 7, n. 4, p. 615-624, 1991.

BRETT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H.. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, v. 351, n. 6329, p. 714-718, 1991.

BRITO, G.A.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.L.; LOTUFO, C.M.; FERREIRA, S.H.; RIBEIRO, R.A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/cGMP/PKG/ ATP-sensitive K channel pathway. *Eur. J. Neurosci.*, v. 24, n. 4, p. 1175-1181, 2006.

CHEN, X.G.; WU, B.Y.; WANG, J.K.; BAI, T. [Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury.]. *Chin. Med. J. (Engl.)*, v. 118, n. 20, p. 1723-1727, 2005.

CHEN, Y.S.; CHIEN, C.T.; MA, M.C.; TSENG, Y.Z.; LIN, F.Y.; WANG, S.S.; CHEN, C.F. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J. Surg. Res.*, v. 126, n. 1, p. 92-101, 2005.

CHEUNG, M.M.; KHARBANDA, R.K.; KONSTANTINOV, I.E.; SHIMIZU, M.; FRNDOVA, H.; LI, J.; HOLTBY, H.M.; COX, P.N.; SMALLHORN, J.F.; VAN ARSDELL, G.S.; REDINGTON, A.N. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: First clinical application in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 47, n. 11, p. 2277-2282, 2006.

CLAVIEN, P. A.; SELZNER, M.; RÜDIGER, H.A.; GRAF, R.; KADRY, Z.; ROUSSON, V.; JOCHUM, W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann. Surg.*, v. 238, n. 6, p. 843-850, 2003.

COCKRELL, A.; LAROUX, F. S.; JOURD'HEUIL, D.; KAWACHI, S.; GRAY, L.; VAN DER HEYDE, H.; GRISHAM, M. B. Role of inducible nitric oxide synthase in leukocyte extravasation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 257, n. 3, p. 684-686, 1999.

COHEN, M. V.; BAINES, C. P.; DOWNEY, J. M. Ischemic preconditioning: From Adenosine receptor to K_{ATP} Channel. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 62, p. 79-109, 2000.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MOSS, D. W.; REES, D.; LEAL, L. M.; MONCADA, S.; CARRIER, M.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. *Immunology*, v. 81, n. 2, p. 211-215, 1994.

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

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems—cyclic AMP and cyclic GMP— on inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 127, n. 3, p. 671–678, 1999.

CUNHA, T. M. Mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides: ativação da via de sinalização intracelular PI3K γ /AKT/óxido nítrico. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

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. *Immune and Glial Regulation of Pain*. Seattle: IASP Press, 2007, p. 67–83.

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. U S A*, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE, L. F.; CAPUTI, A. P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am. J. Respir. Crit. Care Méd.*, v. 162, n. 5, p. 1859-1866, 2000.

DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide*, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2006.

DAL SECCO, D.; PARON, J. A.; DE OLIVEIRA, S. H.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA F. DE Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, v. 9, n. 3, p. 153-164, 2003.

DANGERFIELD, J. P.; WANG, S.; NOURSHARGH, S. Blockade of alpha6 integrin inhibits IL-1beta- but not TNF-alpha-induced neutrophil transmigration in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, v. 77, n. 2, p. 159-65, 2005.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; TOMASZEWSKA, R.; DEMBINSKI, M.; PABIANCZYK, M.; STACHURA, J.; KONTUREK, S. J. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 473, n. 2-3, p. 207-216, 2003.

DE SOUZA GE, FERREIRA SH. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions*, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

DICKSON, E. W.; TUBBS, R. J.; PORCARO, W. A.; LEE, W. J.; BLEHAR, D. J.; CARRAWAY, R. E.; DARLING, C. E.; PRZYKLENK, K. Miocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 283, n. 1, p. 22-28, 2002.

DOS SANTOS, P.; KOWALTOWSKI, A.J.; LACLAU, M.N.; SEETHARAMAN, S.; PAUCEK, P.; BOUDINA, S.; THAMBO, J.B.; TARIOSSE, L.; GARLID, K.D. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 283, n. 1, p. H284-H295, 2002.

DRISCOLL, K. E.; HASSENBEIN, D. G.; HOWARD, B. W.; ISFORT, R. J.; CODY, D.; TINDAL, M. H.; SUCHANEK, M.; CARTER, J. M. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J. Leukoc. Biol.*, v. 58, n. 3, p. 359-364, 1995.

DROST, E. M.; MACNEE, W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur. J. Immunol.*, v. 32, n.2, p. 393-403, 2002.

DUARTE, I.D.; FERREIRA, S.H. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators Inflamm.*, v. 9, n. 1, p. 25– 30, 2000.

DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 186, n. 2-3, p. 289-293, 1990.

EBERLIN, K.R.; MCCORMACK, M.C.; NGUYEN, J.T.; TATLIDEDE, H.S.; RANDOLPH, M.A.; AUSTEN, W.G. JR. Ischemic preconditioning of skeletal muscle mitigates remote injury and mortality. *J. Surg. Res.*, v. 148, n. 1, p. 24-30, 2008.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.*, v. 495, n. Pt 2, p. 429-440, 1996.

EVANS, A.R.; VASKO, M.R.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J. Physiol.*, v. 516, n. Pt 1, p. 163-178, 1999.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions*, v. 30, n. 3-4, p. 344-349, 1990.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat. New Biol.*, v. 240, p. 200-203, 1972.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*, v. 18, n. 2, p. 179-190, 1979.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*, v. 16, n. 1, p. 31-37, 1978.

FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 13 Suppl 5, p. S220-222, 1989.

FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, v. 216, n. 5118, p. 868-873, 1967.

FIGARELLA-BRANGER, D.; CIVATTE, M.; BARTOLI, C.; PELLISSIER, J. F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*, v. 28, n. 6, p. 659-682, 2003.

FORTES, Z. B.; FARSKY, S. P.; OLIVEIRA, M. A.; GARCIA-LEME, J.. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 40, n. 10, p. 1267-1273, 1991.

FOWLER, A. A., 3RD; FISHER, B. J.; SWEENEY, L. B.; WALLACE, T. J.; NATARAJAN, R.; GHOSH, S. S.; GHOSH, S.. Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 77, n. 3, p. 201-208, 1999.

FOX-ROBICHAUD, A.; PAYNE, D.; KUBES, P. Inhaled NO reaches distal vasculatures to inhibit endothelium- but not leukocyte-dependent cell adhesion. *Am. J. Physiol.*, v. 277, n. 6 Pt 1, p. L1224-1231, 1999.

FRANCO-PENTEADO, C. F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S. A.; RIBEIRO-DASILVA, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. *Toxicol.*, v. 39, n. 9, p. 1383-1386, 2001.

FRASSETTO, S. S.; SCHETINGER, M. R.; WEBBER, A.; SARKIS, J. J.; NETTO, C. A. Ischemic preconditioning reduces peripheral oxidative damage associated with brain ischemia in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, n. 10, p. 1295-1302, 1999.

FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SECCO, D.D.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.; BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F.Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, v. 149, n. 4, p. 345-354, 2006.

FUKAHORI, M.; ICHIMORI, K.; ISHIDA, H.; NAKAGAWA, H.; OKINO, H.. Nitric oxide reversibly suppresses xanthine oxidase activity. *Free Radic. Res.*, v. 21, n. 4, p. 203-212, 1994.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GABOURY, J.; WOODMAN, R. C.; GRANGER, D. N.; REINHARDT, P.; KUBES, P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am. J. Physiol.*, v. 265, n. 3 Pt 2, p. H862-867, 1993.

GARCIA LEME, J.; WILHELM, D. L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. *Br. J. Pathol.*, v. 56, p. 402, 1975.

GARLID, K. D.; PAUCEK, P.; YAROV-YAROVOY, V.; MURRAY, H. N.; DARBENZIO, R. B. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.*, v. 81, p. 1072-1082, 1997.

GHOSH, S.; GALIÑANES, M. Protection of the human heart with ischemic preconditioning during cardiac surgery: role of cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 128, n. 1, p. 133-142, 2003.

GINIS, I.; JAISWAL, R.; KLIMANIS, D.; LIU, J.; GREENSPON, J.; HALLENBECK, J. M. TNF- α -induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B transactivation: the role of NF- κ B association with p300 adaptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 22, n. 2, p. 142-152, 2002.

GOETTL, V.M.; LARSON, A.A. Nitric oxide mediates long-term hyperalgesia and antinociceptive effects of the N-terminus of substance P in the formalin assay in mice. *Pain*, v. 67, n. 2-3, p. 435-441, 1996.

GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J. Neurosci.*, v. 18, n. 24, p. 10345-10355, 1998.

GOLD, M.S.; REICHLING, D.B.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na^+ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, n. 3, p. 1108-1112, 1996.

GOLDBERG, N.D.; HADDOX, M.K.; NICOL, S.E.; GLASS, D.B.; SANFORD, C.H.; KUEHL JR., F.A.; ESTENSEN, R. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, v. 5, p. 307-330, 1975.

GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; GOMES LOPES, L.D.; FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 340, n. 2-3, p. 177-180, 1997.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Macrophage-mediated fungistasis: requirement for a macromolecular component in serum. *J. Immunol.*, v. 137, n. 2, p. 693-701, 1986.

GREGER, R.; WINDHORST, U. *Comprehensive human physiology*. Heidelberg: Springer, 1996. p. 773-788.

GROSS, G.J.; PEART, J.N. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, v.285, n. 3, p. H921-H930, 2003.

GUIDOT, D. M.; REPINE, M. J.; HYBERTSON, B. M.; REPINE, J. E. Inhaled nitric oxide prevents neutrophil-mediated, oxygen radical-dependent leak in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.*, v. 269, n. 1 Pt 1, p. L2-5, 1995.

GÜRKE, L.; MARX, A.; SUTTER, P. M.; FRENTZEL, A.; SALM, T.; HARDER, F.; SEELIG, J.; HEBERER, M. Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am. Surg.*, v. 62, n. 5, p. 391-394, 1996.

HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology*, v. 31, n. 3, p. 251– 258, 1992.

HAN, J.; KIM, N.; KIM, E.; HO, W.K., EARM, Y.E. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 25, p. 22140-22147, 2001.

HAN, J.; KIM, N.; JOO, H.; KIM, E.; EARM, Y. E. ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 283, n. 4, p. H1545-H1554, 2002.

HAO, J.X., XU, X.J. Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors. *Pain*, v. 66, n. 2-3, p. 313– 319, 1996.

HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J. Clin. Invest.*, v. 29, p. 115-140, 1950.

HARIMA, A.; SHIMIZU, H.; TAKAGI, H. Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v. 1, n.4, p. 529– 533, 1991.

HARKIN, D. W.; BARROS D`SA, A. A.; McCALLION, K.; HOPER, M.; CAMPBELL, F. C. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *J. Vasc. Surg.*, v. 35, n. 6, p. 1264-1273, 2002.

HIASA, G.; HAMADA, M.; IKEDA, S.; HIWADA, K. Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor-kappaB activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. *Jpn. Circ. J.*, v. 65, n. 11, p. 984-990, 2001.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. *Exp. Physiol.*, v. 82, n. 2, p. 339-348, 1997.

HOLMUHAMEDOV, E. L.; WANG, L.; TERZIC, A. Openers of ATP-sensitive K⁺ channels protect cardiac mitochondria from Ca²⁺ overload. *FASEB J.*, v. 13, p. A1079, 1999.

HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J.O. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci. Lett.*, v. 165, n. 1-2, p. 71-74, 1994.

HUCHO, T.B.; DINA, O.A.; LEVINE, J.D. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J. Neurosci.*, v. 25, n. 26, p. 6119-6126, 2005.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 7, n. 5, p. 697-706, 1995.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. *Inflamm. Res.*, v. 49, n. 8, p. 411-417, 2000.

INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBUTA, S.; YOSHIYA, I. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. *J. Neurol. Sci.*, v. 153, n. 1, p. 1-7, 1997.

ISSEKUTZ, A. C.; ROWTER, D.; SPRINGER, T. A. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, v. 65, n. 1, p. 117-126, 1999.

IVANOV, A.I.; ROMANOVSKY, A.A. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front. Biosci.*, v. 9, p. 1977-1993, 2004.

IWAMOTO, E.T.; MARION, L. Pharmacologic evidence that spinal muscarinic analgesia is mediated by an L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP cascade in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 271, n. 2, p. 601–608, 1994.

JANEWAY, C.A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.*, v. 3, n.13, p. 1167-1171, 2001.

JOHANEK, L.M.; MEYER, R.A.; FRIEDMAN, R.M.; GREENQUIST, K.W.; SHIM, B.; BORZAN, J.; HARTKE, T.; LAMOTTE, R.H.; RINGKAMP, M. A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J. Neurosci.*, v. 28, p. 7659-7669, 2008.

JOHNSTON, B.; KANWAR, S.; KUBES, P. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO. *Am. J. Physiol.*, v. 271, n. 2 Pt 2, p. H614-621, 1996.

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

KANORIA, S.; JALAN, R.; DAVIES, N.A.; SEIFALIAN, A.M.; WILLIAMS, R.; DAVIDSON, B.R. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.*, v. 93, n. 6, p. 762-768, 2006.

KANORIA, S.; JALAN, R.; SEIFALIAN, A.M.; WILLIAMS, R.; DAVIDSON, B.R. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation*, v. 84, n. 4, p. 445-458, 2007.

KAWABATA, A.; FUKUZUMI, Y.; FUKUSHIMA, Y.; TAKAGI, H. Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 218, n.1, p. 153-158, 1992a.

KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br. J. Pharmacol.*, v. 112, n. 2, p. 547–550, 1994.

KAWABATA, A.; NISHIMURA, Y.; TAKAGI, H. L-Leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 107, n. 4, p. 1096– 1101, 1992b.

KAWAHARA, K.; YANOMA, J.; TANAKA, M.; NAKAJIMA, T.; KOSUGI, T. Nitric oxide produced during ischemia is toxic but crucial to preconditioning-induced ischemic tolerance of neurons in culture. *Neurochem. Res.*, v. 29, n. 4, p.797-804, 2004.

KHARBANDA, R. K.; MORTENSEN, U. M.; WHITE, P. A.; KRISTIANSEN, S. B.; SCHIMIDT, M. R.; HOSCHTITZKY, J. A.; VOGEL, M.; SORENSEN, K.; REDINGTON, A. N.; MACALLISTER, R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, v. 106, n. 23, p. 2881-2883, 2002.

KHARBANDA, R.K.; PETERS, M.; WALTON, B.; KATTENHORN, M.; MULLEN, M.; KLEIN, N.; VALLANCE, P.; DEANFIELD, J.; MACALLISTER, R. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation*, v. 103, n. 12, p. 1624-1630, 2001.

KHASAR, S.G.; GOLD, M.S.; LEVINE, J.D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci. Lett.*, v. 256, n. 1, p. 17-20, 1998.

KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; MCMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; MCCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, J.D.; MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*, v. 24, n. 1, p. 253-260, 1999.

KIMURA, T.; ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; SAOTOME, T.; BAMBIA, T. A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 111, p. 484-490, 1998.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science*, v. 169, n. 950, p. 1095-1097, 1970.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 86, n. 13, p. 5159-5162, 1989.

KONSTANTINOV, I.E.; ARAB, S.; KHARBANDA, R.K.; LI, J.; CHEUNG, M.M.; CHEREPANOV, V.; DOWNEY, G.P.; LIU, P.P.; CUKERMAN, E.; COLES, J.G.; REDINGTON, A.N. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol. Genomics*, v. 19, n. 1, p. 143-150, 2004.

KONSTANTINOV, I.E.; ARAB, S.; LI, J.; COLES, J.G.; BOSCARINO, C.; MORI, A.; CUKERMAN, E.; DAWOOD, F.; CHEUNG, M.M.; SHIMIZU, M.; LIU, P.P.; REDINGTON, A.N. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 130, n. 5, p. 1326-1332, 2005a.

KONSTANTINOV, I.E.; LI, J.; CHEUNG, M.M.; SHIMIZU, M.; STOKOE, J.; KHARBANDA, R.K.; REDINGTON, A.N. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*, v. 79, n. 12, p. 1691-1695, 2005b.

KOSIERADZKI, M. Mechanisms of ischemic preconditioning and its application in transplantation. *Ann. Transplant.*, v. 7, n. 3, p. 12-20, 2002.

KRISTIANSEN, S.B.; HENNING, O.; KHARBANDA, R.K.; NIELSEN-KUDSK, J.E.; SCHMIDT, M.R.; REDINGTON, A.N.; NIELSEN, T.T.; BOTKER, H.E. Remote preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 288, n. 3, p. H1252-1256, 2005.

KUBES, P.; SIHOTA, E.; HICKEY, M. J. Endogenous but not exogenous nitric oxide decreases TNF-alpha-induced leukocyte rolling. *Am. J. Physiol.*, v. 273, n. 3 Pt 1, p. G628-635, 1997.

KÜNTSCHER, M.V.; JURAN, S.; ALTMANN, J.; MENKE, H.; GEBHARD, M.M.; GERMANN, G. Role of nitric oxide in the mechanism of preclamping and remote ischemic preconditioning of adipocutaneous flaps in a rat model. *J. Reconstr. Microsurg.*, v.19, n. 1, p. 55-60, 2003a.

KÜNTSCHER, M. V.; KASTELL, T.; ALTMANN, J.; MENKE, H.; GEBHARD, M. M., GERMANN, G. Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery*, v. 22, n. 6, p. 227-231, 2002a.

KÜNTSCHER, M.V.; KASTELL, T.; ENGEL, H.; GEBHARD, M.M.; HEITMANN, C.; GERMANN, G. Late remote ischemic preconditioning in rat muscle and adipocutaneous flap models. *Ann. Plast. Surg.*, v. 51, n. 1, p. 84-90, 2003b.

KÜNTSCHER, M. V.; KASTELL, T.; SAUERBIER, M; NOBILING, R.; GEBHARD, M. M., GERMANN, G. Acute remote ischemic preconditioning on rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*, v. 22, n. 6, p. 221-226, 2002b.

KÜNTSCHER, M. V.; SCHIRMBECK, E. U.; MENKE, H.; KLAR, E.; GEBHARD, M. M., GERMANN, G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 109, n. 7, p. 2398-2404, 2002c.

LAING, K. J.; SECOMBES, C. J. Chemokines. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 28, n. 5, p. 443-460, 2004.

LAURETTI, G.R.; LIMA, I.C.P.R.; REIS, M.P.; PRADO, W.A.; PEREIRA, N.L. Oral ketamine and transdermal nitroglycerin as analgesic adjuvants to oral morphine therapy for cancer pain management. *Anesthesiology*, v. 90, n. 6, p. 1528-1533, 1999.

LEE, S. C.; BRUMMET, M. E.; SHAHABUDDIN, S.; WOODWORTH, T. G.; GEORAS, S. N.; LEIFERMAN, K. M.; GILMAN, S. C.; STELLATO, C.; GLADUE, R. P.; SCHLEIMER, R. P.; BECK, L. A. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J. Immunol.*, v. 164, n. 6, p. 3392-3401, 2000.

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. *Ann. Intern. Med.*, v. 109, n. 2, p. 127-142, 1988.

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

LI, G.; CHEN, S.; LU, E.; LUO, W. Cardiac ischemic preconditioning improves lung preservation in valve replacement operations. *Ann. Thorac. Surg.*, v. 71, n. 2, p. 631-635, 2001.

LIU, G. S.; THORNTON, J.; VAN WINKLE, D. M., STANLEY, A. W. H.; OLSSON, R. A.; DOWNEY, J. M. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, v. 84, p. 350-356, 1991.

LIU, Y.; DOWNEY, J. M. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am. J. Physiol.*, v. 263, p. H1107-1112, 1992.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; MIRMIRAN, R.; PAEZ-ROLLYS, A. J. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. *Transplantation*, v. 61, n. 2, p. 179-183, 1996.

LOUKOGEORGAKIS, S.P.; PANAGIOTIDOU, A.T.; BROADHEAD, M.W.; DONALD, A.; DEANFIELD, J.E.; MACALLISTER, R.J. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 46, n. 3, p. 450-456, 2005.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998.

MA, S.G.; FU, R.F.; FENG, G.Q.; WANG, Z.J.; MA, X.Q.; WENG, S.A. Effect of G(alphaq/11) protein and ATP-sensitive potassium channels on prostaglandin E(1) preconditioning in rat hearts. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 25, n. 5, p. 587-592, 2004.

MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by mu, delta and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 282, n. 2, p. 977-984, 1997.

MAINGRET, F.; COSTE, B.; PADILLA, F.; CLERC, N.; CREST, M.; KOROGOD, S.M.; DELMAS, P. Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J. Gen. Physiol.*, v. 131, n. 3, p. 211-225, 2008.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N. Engl. J. Med.*, v. 317, n. 11, p. 687-694, 1987.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain*, v. 54, n. 3, p. 291-300, 1993.

MARTIN, H.A.; BASBAUM, A.I.; KWIAT, G.C.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience*, v. 22, n. 2, p. 651-659, 1987.

MASADA, T.; HUA, Y; XI, G.; ENNIS, S. R.; KEEP, R. F. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J. Cereb Blood Flow Metab.*, v. 21, n. 1, p. 22-33, 2001.

MATHEIS, G.; SHERMAN, M. P.; BUCKBERG, G. D.; HAYBRON, D. M.; YOUNG, H. H.; IGNARRO, L. J.. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.*, v. 262, n. 2 Pt 2, p. H616-620, 1992.

MAYBAUM, S.; ILAN, M.; MOGILEVSKY, J.; TZIVONI, D. Improvement in ischemic parameters during repeated exercise testing: a possible model for myocardial preconditioning. *Am. J. Cardiol.*, v. 78, n. 10, p. 1087-1091, 1996.

MCCARTNEY-FRANCIS, N. L.; X. SONG; D. E. MIZEL; S. M. WAHL. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J. Immunol.*, v. 166, n. 4, p. 2734-2740, 2001.

MCCLANAHAN, T.B.; NAO, B.S.; WOLKE, L.J., et al. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J.*, v. 7, [abstract], 1993.

MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends Neurosci.*, v. 13, p. 199-201, 1990.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, v. 52, n. 2, p. 127– 136, 1993.

MELLER, S.T.; PECHMAN, O.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, v. 50, n. 1, p. 7– 10, 1992.

MICHEL, T.; LI, G. K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 90, n. 13, p. 6252-6256, 1993.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-NG-Nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, v. 102, n. 1, p. 198– 202, 1992.

MOSES, M.A.; ADDISON, P.D.; NELIGAN, P.C.; ASHRAFPOUR, H.; HUANG, N.; MCALLISTER, S.E.; LIPA, J.E.; FORREST, C.R.; PANG, C.Y. Inducing late phase of infarct protection in skeletal muscle by remote preconditioning: efficacy and mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 289, n. 6, p. R1609-R1617, 2005a.

MOSES, M.A.; ADDISON PD, NELIGAN PC, ASHRAFPOUR H, HUANG N, ZAIR M, RASSULI A, FORREST CR, GROVER GJ, PANG CY. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 288, n. 2, p. H559-H567, 2005b.

MULDER, K.; COLDITZ, I. G. Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, v. 53, n. 3, p. 273-278, 1993.

MULLIGAN, M. S.; HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.; WARD P. A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 88, n. 14, p. 6338-6342, 1991.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000.

MURPHY, E.; GLASGOW, W.; FRALIX, T.; STEENBERGEN, C. Role of lipoxigenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ. Res.*, v. 76, p. 457-467, 1995.

MURRY, C. E., JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, v. 74, p. 1124-1136, 1986.

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

NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 117, n. 3, p. 407-412, 1996.

NAPOLI, C.; PINTO, A.; CIRINO, G. Pharmacological modulation, preclinical studies, and new clinical features of myocardial ischemic preconditioning. *Pharmacol. Ther.*, v. 88, p. 311-331, 2000.

NEWMAN, P. J. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.*, v. 100, n. 11 Suppl., p. S25-29, 1997.

NICOL, G.D.; VASKO, M.R.; EVANS, A.R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J. Neurophysiol.*, v. 77, n.1, p. 167-176, 1997.

NIU, X. F.; IBBOTSON, G.; KUBES, P. A balance between nitric oxide and oxidants regulates mast cell-dependent neutrophil-endothelial cell interactions. *Circ. Res.*, v. 79, n. 5, p. 992-999, 1996.

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

NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE, K.; HARAKAWA, N.; TAKANO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. *J. Leukoc. Biol.*, v. 62, n. 2, p. 203-209, 1997.

NOVALIJA, E.; HOGG, N.; KEVIN, L. G.; CAMARA, A. K.; STOWE, D. F. Ischemic preconditioning: triggering role of nitric oxide-derived oxidants in isolated hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 42, n. 5, p. 593-600, 2003.

ORBAN, J.C.; LEVRAUT, J.; GINDRE, S.; DEROCHE, D.; SCHLATTERER, B.; ICHAI, C.; GRIMAUD, D. Effects of acetylcysteine and ischaemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. *Eur. J. Anaesthesiol.*, v. 23, n. 12, p. 1025-1030, 2006.

O'ROURKE, B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.*, v. 94, n. 4, p. 420-432, 2004.

OXMAN T.; ARAD M.; KLEIN R.; AVAZOV, N.; RABINOWITZ, B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. H1707-1712, 1997.

PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, S. J.; SLIWOWSKI, Z.; PAWLIK, M.; PTAK, A.; DROZDOWICZ, D.; HAHN, E. G. Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 427, n. 3, p. 263-276, 2001.

PARADA, C.A.; YEH, J.J.; JOSEPH, E.K.; LEVINE, J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur. J. Neurosci.*, v. 17, n. 9, p. 1847-1852, 2003.

PELL, T.J.; BAXTER, G.F.; YELLON, D.M.; DREW, G.M. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATPsensitive potassium channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 275, p. H1542-1547, 1998.

PERALTA, C.; BULBENA, O.; XAUS, C.; PRATS, N.; CUTRIN, J. C.; POLI, G.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation*, v. 73, n. 8, p. 1203-1211, 2002.

PERALTA, C.; PRATS, N.; XAUS, C.; GELPÍ, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*, v. 30, n. 6, p. 1481-1489, 1999.

PERRAULT, L. P.; MENASCHÉ, P.; BEL, A.; CHAUMARAY, T. de; PEYNET, J.; MONDRY, A.; OLIVERO, P.; EMANOIL-RAVIER, R.; MOALIC, J. M. Ischemic preconditioning in cardiac surgery: a word of caution. *J. Thorac. Surg.*, v. 112, n. 5, p. 1378-1386, 1996.

PETRISHCHEV, N.N.; VLASOV, T.D.; SIPOVSKY, V.G.; KURAPEEV, D.I.; GALAGUDZA, M.M. Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning? *Pathophysiology*, v. 7, n. 4, p. 271-274, 2001.

PITTROF, R.; LEES, C.; THOMPSON, C.; PICKLES, A.; MARTIN, J.F.; CAMPBELL, S. Crossover study of glyceryl trinitrate patches for controlling pain in women with severe dysmenorrhoea. *Br. Med. J.*, v. 312, n. 7035, p. 884, 1996.

PRADO, W.A.; SCHIAVON, V.F.; CUNHA, F.Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, 2002.

PREMACK, B. A.; SCHALL, T. J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat. Med.*, v. 2, n. 11, p. 1174-1178, 1996.

PRZEWLOCKA, B.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKI, R. Involvement of the nitric oxide pathway in nociceptive processes in the central nervous system in rats. *Regul. Pept.*, v. 1, p. S75-S76, 1994.

PRZEWLOCKI, R.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. *Life Sci.*, v. 53, n. 1, p. PL1- PL5, 1993.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 148, n. 3, p. 1482-1489, 1987.

RAJESH, K.G.; SASAGURI, S.; SUZUKI, R.; XING, Y.; MAEDA, H. Ischemic preconditioning prevents reperfusion heart injury in cardiac hypertrophy by activation of mitochondrial KATP channels. *Int. J. Cardiol.*, v. 96, n. 1, p. 41-49, 2004.

RODENAS, J.; MITJAVILA, M. T.; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 274, n. 3 Pt 1, p. C827-830, 1998.

RODRIGUES, A.R.; DUARTE, I.D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br. J. Pharmacol.*, v. 129, n. 1, p. 110-114, 2000.

ROLLINS, B. J. Chemokines. *Blood*, v. 90, n. 3, p. 909-928, 1997.

RÜDIGER, H. A.; KANG, K. J.; SINDRAM, D.; RIEHLE, H. M.; CLAVIEN, P.A. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in murine liver. *Ann. Surg.*, v. 235, n. 3, p. 400-407, 2002.

RUSH, A.M.; WAXMAN, S.G. PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Res.*, v. 1023, n. 2, p. 264-271, 2004.

SACHS, D., CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; HADDAD, J.J.; MASSAAD, C.A.; JABBUR, S.J.; SAADE, N.E. The role of the sympathetic efferents in endotoxin induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology*, v. 42, n. 6, p. 864-872, 2002.

SAITO, T.; KOMIYAMA, T.; ARAMOTO, H.; MIYATA, T.; SHIGEMATSU, H. Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle in vivo. *J. Surg. Res.*, v. 120, n. 1, p. 111-118, 2004.

SALAS, E.; LANGFORD, E. J.; MARRINAN, M. T.; MARTIN, J. F.; MONCADA, S.; DE BELDER, A. J. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts in vitro and in vivo. *Heart*, v. 80, n. 2, p. 146-150, 1998.

SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J. Neurophysiol.*, v. 60, p. 2180-2195, 1988.

SCHOEMAKER, R.G.; VAN HEIJNINGEN, C.L. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 278, p. H1571-1576, 2000.

SCHUMAN, E.M.; MADISON, D.V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 17, p. 153-183, 1994.

SEGAWA, K.; MINAMI, K.; SHIGA, Y.; SHIRAISHI, M.; SATA, T.; NAKASHIMA, Y.; SHIGEMATSU, A. Inhibitory effects of nicorandil on rat mesangial cell proliferation via the protein kinase G pathway. *Nephron*, v. 87, n. 3, p. 263-268, 2001.

SEN, C. K.; PACKER, L.. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.*, v. 10, n. 7, p. 709-720, 1996.

SERAFÍN, A.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; PRATS, N.; GELPÍ, E.; RODÉS, J.; PERALTA, C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology*, v. 39, n. 3, p. 688-698, 2004.

SIMÃO, A. F. L. Efeito inibitório do pré-condicionamento isquêmico à distância sobre a migração de neutrófilos: mecanismos e mediadores. 2010. 139 f. Tese (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SMITH, C. W. 3. Adhesion molecules and receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 121, n. 2 Suppl., p. S375-379, 2008.

SMITH, C. W. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 71, n. 1, p. 76-87, 1993.

SMITH, R. M.; SULEMAN, N.; McCARTHY, J.; SACK, M. N. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNF α gene. *Cardiovasc. Res.*, v. 55, n. 3, p. 553-560, 2002.

SOARES, A.C.; DUARTE I.D. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.*, v. 134, n. 1, p. 127-131, 2001.

SOARES, A.C.; LEITE, R.; TATSUO, M.A.; DUARTE, I.D. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 400, n. 1, p. 67-71, 2000.

SONCUL, H.; OZ, E.; KALAYCIOGLU, S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest*, v. 115, n. 6, p. 1672-1677, 1999.

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

SOUZA FILHO, M.V.P. Pré-Condicionamento Isquêmico: Repercussões na Sobrevida de Retalhos Cutâneos e na Resposta Inflamatória. 2005. 96 f. Tese (Mestrado em Cirurgia). Departamento de Cirurgia – Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SOUZA FILHO, M.V.P.; LOIOLA, R.T.; ROCHA, E.L.; SIMÃO, A.F.; GOMES, A.S.; SOUZA, M.H.L.P.; RIBEIRO, R.A. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-

inflammatory response by remote organs in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 42, n. 10, p. 921-929, 2009.

SOUZA FILHO, M.V.P.; LOIOLA, R.T.; ROCHA, E.L.; SIMÃO, A.F.; RIBEIRO, R.A. Remote ischemic preconditioning improves the survival of rat random-pattern skin flaps. *Eur. J. Plast. Surg.*, v. 33, n. 3, p. 147-152, 2010.

SPEECHLY-DICK, M. E.; GROVER, G. J.; YELLON, D. M. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ. Res.*, v. 77, p. 1030-1035, 1995.

SUK, K.; S. YEOU KIM; H. KIM. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett*, v. 77, n. 2, p. 79-85, 2001.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, v. 32, n. 3, p. 577-580, 1989.

TAKAGI, H.; HARIMA, A.; SHIMIZU, H. A novel clinical treatment of persistent pain with L-arginine. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 183, n. 4, p. 1443. 1990.

TAKAOKA, A.; NAKAE, I.; MITSUNAMI, K.; YABE, T.; MORIKAWA, S.; INUBUSHI, T.; KINOSHITA, M. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: Effects of "remote preconditioning". *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 33, n. 2, p. 556-564, 1999.

TAKTAK, Y. S.; LEE, M. A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. Clinical evaluation. *J. Immunol. Methods*, v. 136, n. 1, p. 11-16, 1991.

TAMION, F.; RICHARD, V.; LACOUME, Y.; THUILLEZ, C. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 283, n. 2, p. 408-414, 2002.

TAPURIA, N.; KUMAR, Y.; HABIB, M.M.; AMARA, M.A.; SEIFALIAN, A.M.; DAVIDSON, B.R. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury - a review. *J. Surg. Res.*, v. 150, n. 2, p. 304-330, 2008.

TAVARES-MURTA, B.M.; MACHADO, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. *Inflammation*, v. 25, n. 4, p. 247-253, 2001.

TESSIER, P. A.; NACCACHE, P. H.; DIENER, K. R.; GLADUE, R. P.; NEOTE, K. S.; CLARK-LEWIS, I.; MCCOLL, S. R. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF-alpha. *J. Immunol.*, v. 161, n. 3, p. 1204-11, Aug 1, 1998.

TOKUNO, S.; HINOKIYAMA, K.; TOKUNO, K.; LÖWBEER, C.; HANSSON, L.O.; VALEN, G. Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 22, n. 6, p. 995-1001, 2002.

TORRAS, J.; HERRERO-FRESNEDA, I.; LLOBERAS, N.; RIERA, M.; MA CRUZADO, J.; MA GRINYÓ, J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.*, v. 61, n.6, p. 2218-2227, 2002.

TSUKADA, K.; OMERT, L. A.; MENEZES, J.; HARBRECHT, B. G.; MIYAGISHIMA, M.; HIERHOLZER, C.; BILLIAR, T. R. Neutrophil accumulation and damage to the gastric mucosa in resuscitated hemorrhagic shock is independent of inducible nitric oxide synthase. *Shock*, v. 11, n. 5, p. 319-324, 1999.

UNAL, S.; DEMIRKAN, F.; ARSLAN, E.; CIN, I.; CINEL, L.; ESKANDARI, G.; CINEL, I. Comparison of ischemic and chemical preconditioning in jejunal flaps in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 112, n. 4, p. 1024-1031, 2003.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council – Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, 1985. 83 p.

VAHLHAUS, C.; SCHULZ, R.; POST, H. ONALLAH, R.; HEUSCH, G. No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ. Res.*, v. 79, p. 407-414, 1996.

VALE, M.L.; ROLIM, D.E.; CAVALCANTE, I.F.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. Role of NO/cGMP/KATP pathway in antinociceptive effect of sildenafil in zymosan writhing response in mice. *Inflamm. Res.*, v. 56, n. 2, p. 83-88, 2007.

VANDER HEIDE, R.S.; HILL, M.L.; REIMER, K.A.; JENNINGS, R.B. Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: relationship to ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell Cardiol.*, v. 28, n. 1, p. 103-112, 1996.

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.*, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VERRI JR., W.A.; SCHIVO, I.R.; CUNHA, T.M.; LIEW, F.Y.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 310, n. 2, p. 710-717, 2004.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Ver.*, v. 79, n. 1, p. 181-213, 1999.

VIVANCOS, G.G.; VERRI, W.A. JR; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004.

VLASOV, T.D.; KORZHEVSKIĬ, D.E.; POLIAKOVA, E.A. Ischemic adaptation of the rat brain as a method for protection of endothelium from ischemic reperfusion injury. *Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.*, v. 90, n.1, p. 40-48, 2004.

VON STEBUT, E.; METZ, M.; MILON, G.; KNOP, J.; MAURER, M. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood*, v. 101, n. 1, p. 210-215, 2003.

VUORINEN, K.; YLITALO, K.; PEUHKURINEN, K.; RAATIKAINEN, P.; ALA-RÄMI, A.; HASSINEN, I.E. Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation*, v. 91, n. 11, p. 2810-2818, 1995.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration during endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, v. 66, n. 1, p. 10-24, 1999.

WANG, N.P.; BUFKIN, B.L.; NAKAMURA, M.; ZHAO, Z.Q.; WILCOX, J.N.; HEWAN-LOWE, K.O.; GUYTON, R.A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.*, v. 67, n. 6, p. 1689-1695, 1999.

WANG, Y.; XU, H.; MIZOGUCHI, K.; OE, M.; MAETA, H. Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role for inducible nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.*, v. 49, p. 391-398, 2001.

WANG, Y.P.; MAETA, H.; MIZOGUCHI, K.; SUZUKI, T.; YAMASHITA, Y.; OE, M. Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel. *Cardiovasc. Res.*, v. 55, n. 3, p. 576-582, 2002.

WATSON, M. L.; KINGSMORE, S. F.; JOHNSTON, G. I.; SIEGELMAN, M. H.; LE BEAU, M. LEMONS, M.; R. S.; BORA, N. S.; HOWARD, T. A.; WEISSMAN, I. L.; MCEVER R. P.; ET AL. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J. Exp. Med.*, v. 172, n. 1, p. 263-272, 1990.

WEINBRENNER, C.; NELLES, M.; HERZOG, N.; SÁRVÁRY, L.; STRASSER, R.H. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: A newly identified non-neuronal but PKCdependent pathway. *Cardiovasc. Res.*, v. 55, n. 3, p. 590-601, 2002.

WEINBRENNER, C.; SCHULZE, F.; SARVARY, L.; STRASSER, R.H. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc. Res.*, v. 61, n. 3, p. 591-599, 2004.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

WEISSMANN, G.; KORCHAK, H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation*, v. 8 Suppl, p. S3-14, 1984.

WOLFRUM, S.; SCHNEIDER, K.; HEIDBREDER, M.; NIENSTEDT, J.; DOMINIAK, P.; DENDORFER, A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc. Res.*, v.55, n. 3, p. 583-589, 2002.

WOLKOW, P. P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm. Res.*, v. 47, n. 4, p. 152-166, 1998.

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

XU, J.Y.; PIEPER, G.M.; TSENG, L.F. Activation of a NO-cyclic GMP system by NO donors potentiates beta-endorphin-induced antinociception in the mouse. *Pain*, v. 63, n. 3, p. 377– 383, 1995.

YAN, X. T.; TUMPEY, T. M.; KUNKEL, S. L.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N.. Role of MIP-2 in neutrophil migration and tissue injury in the herpes simplex virus-1-infected cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 39, n. 10, p. 1854-1862, 1998.

YANG, L.; FROIO, R. M.; SCIUTO, T. E.; DVORAK, A. M.; ALON, R.; LUSCINSKAS, F. W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, v. 106, n. 2, p. 584-592, 2005.

ZEILHOFER, H.U.; ZEILHOFER, U.B. Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci. Lett.*, v. 437, p. 170-174, 2008.

ZHANG, C.; ROSENBAUM, D. M.; SHAIKH, A. R.; LI, Q.; ROSENBAUM, P. S.; PELHAN, D. J.; ROTH, S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 43, n. 9, p. 3059-3066, 2002.

ZHANG, F.; OSWALD, T.; HOLT, J.; GERZENSHTEIN, J.; LEI, M. P.; LINEAWEAVER, W. C. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann. Plast. Surg.*, v. 52, n. 6, p. 609-613, 2004.

ZHOU, Z.; DAVAR, G.; STRICHARTZ, G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. *J. Neurosci.*, v. 22, n. 15, p. 6325-6330, 2002.

ZHUO, M.; MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain*, v. 54, n. 1, p. 71– 78, 1993.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-10, 1983.

ANEXOS



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº094/09, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E DOR INFLAMATÓRIA – PARTICIPAÇÃO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO-GMPC-CANAIS K+ATP”** de responsabilidade de Marcus Vinicius Pontes de Souza Filho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 25 de novembro de 2010.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA