



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**PAPEL DAS POLIAMINAS PERIFÉRICAS NO DESENVOLVIMENTO
DA DOR INFLAMATÓRIA EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariane Arnoldi da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2010

PAPEL DAS POLIAMINAS PERIFÉRICAS NO DESENVOLVIMENTO DA DOR INFLAMATÓRIA EM RATOS

Por

Mariane Arnoldi da Silva

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A comissão examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**PAPEL DAS POLIAMINAS PERIFÉRICAS NO DESENVOLVIMENTO
DA DOR EM RATOS**

elaborada por

Mariane Arnoldi da Silva

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Juliano Ferreira, Dr. (Orientador)

Michel Fleith Otuki, Dr. (UEPG)

Roselei Fachinetto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 21 de julho de 2010.

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, cujos estímulos me impulsionaram a trilhar meu caminho em busca a uma vida nova, e pelo exemplo de responsabilidade, luta e persistência.

AGRADECIMENTOS

A concretização dessa dissertação de mestrado não seria possível sem a colaboração de várias pessoas, às quais eu gostaria de agradecer:

A minha família, em especial, meus pais Miriane e Juarez, meu irmão Matheus e minha Avó Valdemira, pela força, dedicação, carinho e incentivo constante, além da oportunidade dada por vocês, que estiveram presentes em todos os inúmeros momentos bons e ruins dessa caminhada. Meu eterno agradecimento.

Ao professor Juliano Ferreira pela possibilidade de trabalhar sob a sua orientação, como pela oportunidade de crescimento e pelos conhecimentos adquiridos no seu laboratório, meu obrigado.

Aos professores da banca, Michel Otuki e Roselei Fachinetto, por terem aceito avaliar esse trabalho.

Aos meus queridos amigos e colegas de trabalho, Mateus Fortes Rossato, Camila Gewehr, Flávia Karine Rigo, Gabriela Trevisan e Cristiane Walker que participaram de forma direta e indireta nesse trabalho, porém de maneira incondicional, pela constante disponibilidade, dedicação, força e pela grande amizade, que não somente contribuíram para meu crescimento profissional, como para um crescimento pessoal, meu eterno obrigado.

Ao meu colega e amigo Jonatas Zeni Klafke pela amizade inabalável, pelas palavras de compreensão e apoio, pelas inúmeras “brincas” e pelas palavras de incentivo, e principalmente pela paciência incansável. Agradecer, pelos momentos de puro tédio, pelos diversos momentos de diversão, pelas muitas horas de trabalho infatigável, e por muitas madrugadas de conversas sérias ou uma boa fofoca. Obrigada, seria pouco para expressar o quanto foi importante durante essa trajetória.

Aos meus colegas do Labneuro pela ajuda e amizade constante, sendo durante os períodos de trabalho, ou nos momentos de confraternização e lazer, obrigada.

Agradeço, enfim a Universidade Federal de Santa Maria e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos. Meu muito obrigada!

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.

A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PAPEL DAS POLIAMINAS PERIFÉRICAS NO DESENVOLVIMENTO DA DOR INFLAMATÓRIA EM RATOS

Autor: Mariane Arnoldi da Silva

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da defesa: Santa Maria, 21 de julho de 2010.

Poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são aminas alifáticas produzidas pela ação da ornitina descarboxilase (ODC), enzima limitante e proteína quinase C (PKC), passo regulatório da síntese de poliaminas. Desde que níveis elevados de poliaminas foram encontrados no fluído sinovial em pacientes com artrite, o objetivo do presente estudo foi investigar a produção de poliaminas periféricamente em modelo de dor inflamatória induzido por CFA. A injeção subcutânea do adjuvante completo de Freund (CFA, 50 μ L/pata) causou o desenvolvimento de alodínia mecânica e edema, bem como um aumento na expressão e atividade da ODC e na ativação da PKC. A administração prévia do inibidor seletivo da ODC, o DMFO (10 μ mol/pata), foi capaz de prevenir o desenvolvimento da alodínia e edema, bem como o aumento da atividade produzida pela injeção de CFA. Além disso, a pré-administração do inibidor da PKC o GF109203 (1 nmol/pata), reduziu a alodínia e o aumento da atividade da ODC em animais injetados com CFA. De acordo com a inibição da síntese, também observamos que a injeção subcutânea de putrescina (10 μ mol/pata), espermidina (3-10 μ mol/pata) ou espermina (0,3-3 μ mol/pata) na pata de ratos desenvolveu alodínia mecânica e edema. O presente estudo sugere que as poliaminas sintetizadas endogenamente estão envolvidas no desenvolvimento da nocicepção e edema causado pelo CFA. Além disso, as poliaminas produzidas nos sítios de inflamação estão relacionadas com o aumento na atividade da ODC estimulada pela ativação da PKC. Assim, o controle da síntese das poliaminas e função poderia ser um interessante alvo para o controle da dor inflamatória.

Palavras chaves: artrite; DFMO; dor; edema, inflamação; ODC.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Sants Maria, RS, Brazil

ROLE OF PERIPHERAL POLYAMINES IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PAIN IN RATS

Author: Mariane Arnoldi da Silva

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, July 21th, 2010.

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are aliphatic amines produced by the action of ornithine descarboxylase (ODC), a rate-limiting and protein kinase C (PKC)-regulated step in polyamine synthesis. Since the levels of polyamines were found to be high in synovial fluid of arthritic patients, the aim of the present study was to identify the role of peripherally produced polyamines in the model of inflammatory pain induced by adjuvant arthritis. The subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant (CFA, 50 μ L/paw) caused the development of mechanical allodynia and edema. Moreover, it increased ODC expression and activity as well as PKC activation. The previous administration of the selective ODC inhibitor DFMO (10 μ mol/paw) was capable of preventing the development of allodynia and edema as well as the increase in ODC activity produced by CFA injection. Furthermore, the previous administration of the PKC inhibitor GF109203X (1 nmol/paw) reduced allodynia and the increase of ODC activity in animals injected with CFA. Accordingly with the synthesis inhibition, we have observed that subcutaneous injection of putrescine (10 μ mol/paw), spermidine (3-10 μ mol/paw) or spermine (0.3-3 μ mol/paw) into the rat paw also caused mechanical allodynia and edema. The present results suggest that endogenously synthesized polyamines are involved in the development of nociception and edema caused by the adjuvant. Moreover, the polyamine production in inflammatory site seems to be related with the increase in ODC activity stimulated by PKC activation. Thus, the control of polyamine synthesis and action could be an interesting target to control inflammatory pain.

Key words: arthritis; DFMO; edema; inflammation; ODC; pain.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdoMetDC	S-adenosilmetionina descarboxilase
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ANOVA	Análise de variância
APAO	N ¹ acetilpoliamina oxidase
BSA	Albumina sérica bovina
CFA	adjuvante completo de Freund
DFMO	α -difluorometilornitina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	Ácido dietilaminotetraacético
g	Gramas
i.t.	Intratecal
Mg ²⁺	Magnésio
MK-801	Maleato de (+)5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-imino
MTA	5-deoxi-5'-(metiltio)adenosina
NMDA	N-metil-D-aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
PKC	proteína quinase C
SAM-D	S-adenosil metionina descarboxilase
SDS-PAGE	Gel de eletroforese em poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio
SMO	Espermina oxidase
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SSAT	N ¹ acetiltransferase
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
μ M	Micromolar

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Histórico das poliaminas.....	9
Figura 1. Estrutura das poliaminas.....	10
Figura 2. Síntese das poliaminas.....	11

MANUSCRITO

Figure 1. Time-courses (A and C) and dose-response curves (B and D) of the ODC inhibitor DFMO effects on mechanical allodynia (A and B) and paw edema (C and D) induced by CFA. The dose-response data for allodynia or edema were assessed 4 or 6 hours, respectively, after CFA injection.....	44
Figure 2. Time-courses (A, C and E) and dose-response curves (B, D and F) for the induction of mechanical allodynia in rats by peripheral injection of putrescine, spermidine or spermine.....	45
Figure 3. Time-courses (A, C and E) and dose-response curves (B, D and F) for the induction of paw edema in rats by peripheral injection of putrescine, spermidine or spermine.....	46
Figure 4. A) Effect of CFA on ODC activity in the injected tissue. B) Effect of the pre-treatment with DFMO or its vehicle on ODC activity in rats injected with CFA or PBS.....	47
Figure 5. Effect of CFA on ODC protein expression in injected tissue.....	48
Figure 6. Effect of CFA on PKC activation assessed by the expression of total form (A) and phosphorylated form (B) as well as the relation in total and phosphorylated forms of PKC α (C).....	49
Figure 7. Effect of the pre-treatment with GF109203X on mechanical allodynia (A) and paw edema (B) assessed 4 hours after CFA.....	50
Figure 8. Effect of GF109203X on ODC activity of CFA or PBS-treated rats.....	51

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo Geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. Histórico e características das poliaminas.....	9
4.2. Dor relacionada à inflamação.....	16
4.3. Papel das poliaminas na dor.....	18
5. ARTIGO.....	22
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS.....	60

1. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo. As seções Materiais e Métodos e Resultados, encontram-se no próprio artigo.

Os itens discussão, conclusões e referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão desta dissertação.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica *Biochemical Pharmacology* a qual foi submetido.

2. INTRODUÇÃO

A dor é a principal causa de atendimentos de pacientes em serviços de saúde. As desordens inflamatórias como as artrites estão entre as situações dolorosas crônicas que mais freqüentemente afetam a população mundial, tendo um forte impacto na qualidade de vida, no uso de recursos e de cuidados médicos, e na economia de um país. Concomitantemente, estas circunstâncias causam uma condição de inabilidade ao trabalho principalmente entre homens e mulheres na faixa etária de 16-72 anos. Aproximadamente um terço de todos os estadunidenses adultos são afetados pela dor, inchaço, ou pela limitação dos movimentos relacionados à artrite (Lawrence et al., 1998). Assim, a descoberta de mecanismos e novas terapêuticas para a dor relacionada á artrite torna-se cada vez mais importante, uma vez, que as terapias usadas para o tratamento da doença possuem um efeito limitado, além de produzirem diversos efeitos adversos nos pacientes.

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são pequenas aminas alifáticas presentes em todas as células. A putrescina é resultante da descarboxilação do aminoácido ornitina pela ação da ornitina descarboxilase (ODC – E.C 4.1.1.17), uma das enzimas limitantes da rota de síntese das poliaminas. Em seguida a putrescina é convertida em espermidina pela espermidina sintase, que sofre ação da espermina sintase formando a espermina (Casero e Marton, 2007; Kusano et al., 2008). A ODC é uma proteína com tempo de meia vida curto (10 min-1 hora) e sua atividade e expressão são altamente reguladas pela disponibilidade de poliaminas no organismo e pela ativação da proteína quinase C (PKC) (Wallace, 2003; Pegg, 2006; Zhao, 2009). Além da origem da síntese endógena, as poliaminas são derivadas exogenamente, a partir da dieta e pela absorção intestinal de produtos do metabolismo bacteriano (Larqué et al., 2007)

Várias ações das poliaminas no SNC são conhecidas, e experimentos *in vivo* observaram que a administração de espermidina no hipocampo e na amígdala leva a melhora na memória e no aprendizado no teste de esquiva inibitória (Rubin et al., 2001; Berlese et al., 2005). Estudos também observaram que uma dieta pobre em poliaminas, em conjunto com uma administração de antibiótico (para a redução os níveis de poliaminas derivadas da microflora) aliviaram a hiperalgisia induzida por incisão, inflamação ou neuropatia em ratos, e esse efeito parece ter sido mediado por receptores NMDA localizados na medula espinhal (Estebe et al., 2006; Rivat et al., 2008). Além disso, sabe-se que a administração intratecal (i.t) de espermina produziu comportamentos dolorosos em ratos e camundongos e que esses efeitos

foram revertidos pela administração de antagonistas do receptor NMDA (Tao-No et al., 2000; Kolhekar et al., 1994). Todos esses receptores são encontrados no sistema nervoso central (SNC), bem como no sistema nervoso periférico (SNP) (Mezey et al., 2000; Carlton et al., 2001; Calixto et al., 2005).

No entanto, o papel das poliaminas no SNP ainda permanece desconhecido. De maneira interessante, níveis aumentados de poliaminas são encontrados no tecido e líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite, artrite pós-traumática e artrite infecciosa (Yukioka, 1992). Além disso, estudos demonstraram que níveis elevados de ODC são encontrados em tecido inflamado (Pillai et al., 1999), o que reforça a idéia de que estas substâncias poderiam ser importantes moduladores endógenos da dor não somente no SNC, mas também no SNP. Assim, o controle dos níveis de poliaminas poderia ser um mecanismo importante no controle da dor em desordens inflamatórias, como a artrite.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel nociceptivo das poliaminas periféricas em um modelo de dor relacionado à artrite em ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o papel das poliaminas endógenas usando o inibidor da ODC na nocicepção e edema causado pela administração do adjuvante completo de Freund (CFA);
- Verificar o efeito nociceptivo e edematogênico da administração exógena de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina);
- Determinar a atividade e expressão da ODC no tecido inflamado de ratos tratados com CFA;
- Verificar o efeito da ativação da PKC na nocicepção, edema e na atividade e expressão da ODC induzido pela administração de CFA;

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Histórico e características das poliaminas

As poliaminas foram descritas pela primeira vez há mais de 300 anos atrás, especificamente em 1678, onde Antoni van Leeuwenhoek relatou a presença de certos cristais em amostras de esperma seco (Tabela I). Duzentos anos depois, Schreiner identificou estes cristais como fosfatos de uma nova base orgânica, embora ele tenha proposto a fórmula errada. Em 1924, Rosenheim descobriu a estruturas das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), e finalmente a síntese das poliaminas foi estabelecida. Já em 1941, o pesquisador Raina Hämälaine observou níveis elevados de poliaminas em fígado degenerado de ratos, e acumulação de poliaminas em embriões de galinhas, mostrando que essas aminas eram também encontradas em diferentes tecidos (Carter, 1994; Bachrach et al., 2010).

Após 30 anos, em 1971 Russell, observou que as poliaminas eram liberadas pelas células cancerígenas e poderiam ser detectadas em fluídos como sangue e urina, tornando-se importante para o controle da evolução do câncer, e no tratamento dos pacientes. Em 1978, Metcalf desenvolveu a síntese de um inibidor para a síntese de poliaminas, surgindo o inibidor α -difluorometilornitina (DFMO) (Carter, 1994; Bachrach et al., 2010).

Tabela I. História das poliaminas

1678 – A. van Leeuwenhoek	Cristais
1878 – P. Schreiner	Base orgânica da espermina
1924 - O Rosenheim	Estrutura e síntese das poliaminas
1941 - R. Hämälainen	Poliaminas nos tecidos
1971 - D.H. Russell	Poliaminas e câncer
1978 - B.W. Metcalf	Síntese do DFMO

Reproduzido de Bachrach et al., 2010.

Hoje sabemos que as poliaminas naturais – putrescina, espermidina e espermina – são ubíquas na natureza, sendo encontradas em todas as células procarióticas e eucarióticas. Elas podem ser definidas como aminas que contêm duas ou três cadeias de carbono alifáticas e flexíveis conectadas por átomos de nitrogênio. Elas ainda carregam dois grupamentos amino primários em cada ponta da cadeia e, em virtude disto, as poliaminas apresentam uma natureza alcalina. A caracterização das suas estruturas químicas nos revela que a putrescina é uma diamina (1,4-diaminobutano), a espermidina é uma triamina (mono-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano), a espermina é uma tetramina (bis-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Teti et al., 2002).

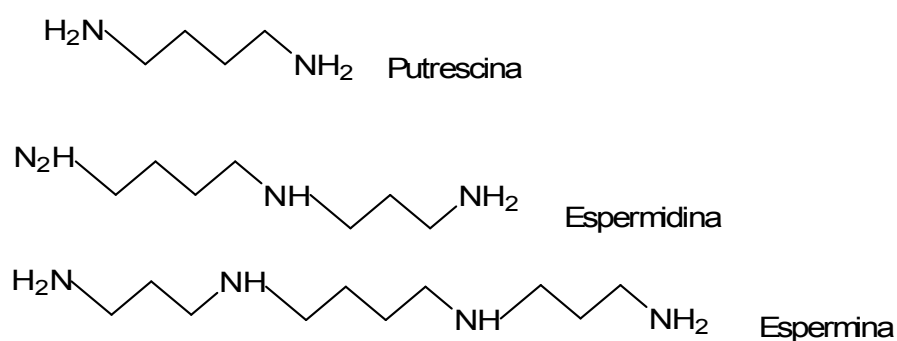


Figura 1. Estruturas das poliaminas.

O nível celular adequado de poliaminas é alcançado através de um balanço entre sua biossíntese, degradação e captação. Na biossíntese, o principal precursor das poliaminas é o aminoácido ornitina, um intermediário do ciclo da uréia formado a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Seiler, 1994; Carter, 1994). Em mamíferos, a ornitina formada é então descarboxilada por ação da ornitina descarboxilase (ODC) dando origem a putrescina (Figura 2).

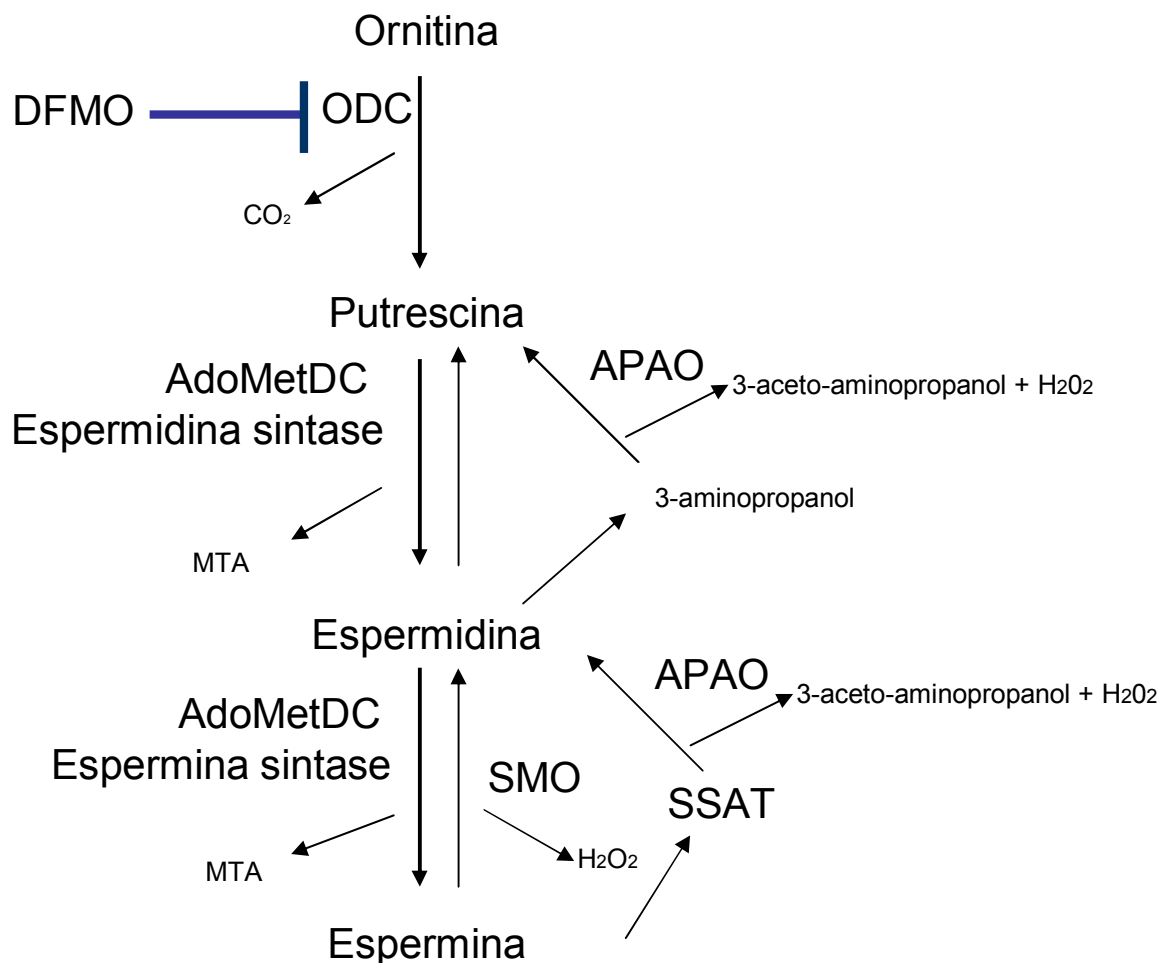


Figura 2. Síntese das poliaminas. DFMO (α-diflorometilornitina), ODC (ornitina descarboxilase), APAO (N¹ acetilpoliamina oxidase), SSAT (N¹ acetiltransferase) e AdoMetDC (S-adenosilmetionina descarboxilase), MTA (5'-deoxi-5'-(metioltio)adenosina e SMO (espermina oxidase).

A partir daí, a enzima espermidina sintase transfere um grupamento aminopropil de uma molécula de S-adenosil-metionina descarboxilada (SAM-D) para a putrescina, dando origem a espermidina. A espermidina formada pode sofrer ação da enzima espermina sintase, a qual transfere um segundo grupamento aminopropil de outra molécula de SAM-D para a espermidina originando a espermina (Seiler, 1994; Casero e Marton, 2007).

Dentre as enzimas que fazem parte da biossíntese das poliaminas, a ODC enzima limitante dessa síntese, sendo sua atividade bastante exigida na proliferação celular, o que vem sendo demonstrada em estudos com tecidos. Além disso, a ODC

é uma proteína de meia-vida curta (10 min – 1 h) e sua expressão, como atividade são altamente reguladas, sendo pela disponibilidade de poliaminas no organismo, ou uma anti-enzima, e pela proteína quinase C (PKC) (Pegg, 2006; Casero, 2007; Zhao, 2009). Devido as poliaminas serem necessárias para o crescimento celular e sua via metabólica ser freqüentemente desregulada em cânceres, tornou-se necessário o desenvolvimento de inibidores para a síntese de poliaminas (Casero, 2007; Davidson et al; 1999).

Assim, em 1978 foi descoberto o inibidor irreversível da ODC, o DFMO (Bachrach, 2010). Inicialmente ele concorre com o sítio ativo da ODC, o DFMO então descarboxilado pela ODC forma intermediários altamente reativos que inativam a enzima ODC, formando ligações covalentes ou com resíduos de Cis360 (predominantemente) ou Lis69. Estudos em cultura de tecidos mostram que a inibição com o DFMO foi capaz de reduzir quase que por completo a concentração de putrescina e espermidina, o que é acompanhada por uma diminuição da taxa de crescimento celular, porém seus efeitos sobre a espermina são variáveis (Casero, 2007). Posteriormente, o DFMO foi avaliado clinicamente contra vários modelos de cânceres, incluindo melanoma, câncer de mama, próstata, tanto como um agente único ou em combinação com outros agentes (Levin et al; 2003).

Já a degradação, ocorre devido à rota de síntese de poliaminas descrita acima ser interconversível, ou seja, a espermina pode ser convertida em espermidina e esta em putrescina. O primeiro passo da interconversão é a acetilação da espermina na posição N1 pela ação da SSAT. Após, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, liberando os grupos aminopropil provenientes da SAM-D por ação da enzima poliamina oxidase (SMO) (Seiler, 1994). Juntamente com o transporte das poliaminas, essa rota regula a sua homeostase intracelular. O catabolismo final destas amins é catalisado por amino-oxidases (APAO) dependentes de cobre, as quais convertem as mesmas a aldeídos que, posteriormente, são transformados em aminoácidos, sendo então excretados pela via renal.

Ocorre também a captação das poliaminas, em que bactérias do trato gastrointestinal são capazes de metabolizar aminoácidos da dieta e produzir poliaminas. Além disso, alimentos de origem animal (leite, ovos, peixe, carne), frutas, verdura e produtos fermentados (queijo, cerveja, chucrute, molho de soja fermentado) são particularmente ricos em poliaminas. Tanto as poliaminas

sintetizadas por bactérias como as provenientes da dieta são parcialmente absorvidas pelo trato gastrointestinal e podem, subseqüentemente, ser transportadas para o interior das células por meio de carreadores (Bardocz et al., 1996; Larqué et al., 2007).

Nos vertebrados, as poliaminas estão largamente distribuídas em todos os tecidos. No interior das células, elas podem ser encontradas tanto ligadas a macromoléculas (principalmente ácidos nucléicos) quanto em sua forma livre, a qual se estima esteja em torno dos 7-10% do conteúdo celular total dessas aminas (Seiler, 1990; Jänne et al., 1991).

As poliaminas são encontradas, em altas concentrações intracelulares, no sistema nervoso central (SNC). Evidências indicam que a espermina e a espermidina podem exercer a função de neurotransmissores ou neuromoduladores, por: a) serem encontradas em altas concentrações intracelulares (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1991), b) serem liberadas de maneira dependente de cálcio após estimulação química ou elétrica (Fage et al; 1992), c) por existir um sistema de recaptação de alta afinidade para regular os níveis extracelulares de poliaminas (Gilad & Gilad, 1991), e d) por interagirem com canais iônicos no SNC, regulando sua atividade (Williams, 1997; Ahern, 2006).

Dentre as interações com canais iônicos, foram observados que tanto as poliaminas intracelulares, quanto extracelulares desenvolviam um efeito modulatório sobre os receptores glutamatérgicos (Williams, 1997; Ahern, 2006). Os efeitos das poliaminas sobre o receptor NMDA foram primeiramente relatados por Ransom e Stec (1988), os quais mostraram que baixas concentrações de espermina e espermidina aumentam a ligação do [³H] MK-801 a este receptor. Por outro lado, altas concentrações destas poliaminas não foram tão efetivas no aumento da ligação do [³H] MK-801 ao receptor NMDA, levando a uma redução do aumento da ligação e resultando, desta forma, numa curva concentração – resposta bifásica (Williams et al., 1989).

A partir deste estudo, vários grupos mostraram resultados similares em diversas preparações (Williams et al., 1989; Yoneda et al., 1991; Romano et al., 1991; Bakker et al., 1991). Adicionalmente, estudos eletrofisiológicos respaldam estes achados. A partir da observação desta diversidade de efeitos distintos apresentados pelas poliaminas, foi proposta a hipótese da existência de diferentes sítios de ligação para as mesmas no receptor NMDA (Sharma e Reynolds, 1998).

Sendo assim, sua atividade modulatória poderia se dar de três formas distintas, onde é possível então observar que há dois sítios para agonistas e um para antagonistas poliaminérgicos (Johnson, 1996; Worthen et al., 2001). Um primeiro sítio seria de alta afinidade, onde as poliaminas potencializariam a ligação [¹²⁵I] MK-801 ao receptor NMDA. Uma segunda seria de baixa afinidade, pois concentrações maiores que 100 µM, ocorreria a inibição do [¹²⁵I] MK-801 ao receptor. E por fim, teríamos um sítio inibitório, no qual se ligam os antagonistas poliaminérgicos (Sharma & Reynolds, 1998). Receptores NMDA nativos são hetero – oligômeros compostos por combinações entre as subunidades NR1, NR2 e NR3, as poliaminas se ligam a subunidade NR2B (Williams, 1997; Paoletti & Neyton, 2007).

Além disso, estudos mostraram que a injeção na pata de ratos de AMPA, NMDA e cainato produziram respostas comportamentais, caracterizadas como alodínia e hiperalgesia mecânica e térmica, indicando que o glutamato tem um papel, bem como os receptores AMPA/cainato e NMDA possuem um importante papel na transmissão da dor tanto periférica, quanto central (Zhou, 1996). Além disso, antagonistas do receptor NMDA também foram capazes de inibir os estímulos causados pela ativação desses receptores, o que reforça a ideia do envolvimento desses receptores em processos patológicos, por estímulos nocivos, injúria ou por inflamação periférica (Haley, 1992; Ren, 1992).

Além do receptor NMDA, as poliaminas também se ligam ao receptor vanilóide TRPV1, um membro da família de receptores de potencial transitório (TRP). O receptor TRPV1 é formado por seis domínios transmembrana contendo suas porções amino e carboxi terminais localizados intracelularmente (para revisão ver Calixto et al., 2005; Caterina e Julius, 1999, 2001). O receptor TRPV1 pode ser ativado por várias substâncias exógenas irritantes, como capsaicina (presente na pimenta), resiniferatoxina (da planta *Euphorbia resinifera*), e também por ligantes endógenos, como anandamina, produtos da lipoxigenase. O papel de ligantes endógenos do receptor TRPV1 em processos dolorosos tem sido apresentado por estudos que mostraram que respostas nociceptivas induzidas por processos inflamatórios foram inibidas pela capsazepina (antagonista do receptor TRPV1) (Ferreira, et al., 2004).

Além dessas substâncias exógenas, as poliaminas também possuem um papel modulatório no receptor TRPV1, sendo que possuem um sítio extracelular no receptor (Ahern et al, 2006; Calixto 2005). Estudos mostraram que as poliaminas,

principalmente espermidina e espermina podem permear e ativar diretamente esses receptores, tanto em células HEK293, quanto que em neurônios sensoriais. Além disso, também foi observado que a espermina é capaz de potencializar a despolarização de neurônios sensoriais induzidos por capsaicina, e que a sensibilização pela espermina foi prevenida por altas concentrações de prótons e Mg^{2+} . E que as poliaminas também podem permear o receptor TRPV1, como ocorre com alguns cátions (Ca^{2+} e Na^+) (Ahern et al; 2006). A ativação do receptor está relacionada com processos inflamatórios, uma vez, que estudos demonstraram que a ablação gênica do receptor TRPV1 reduz não somente a sensibilidade a capsaicina, mas também a nocicepção relacionada a processos inflamatórios (Caterina et al; 2002; Ahern et al; 2007).

Alguns estudos também observaram o importante papel dos ligantes endógenos do receptor TRPV1 em processos dolorosos, através da observação de que respostas nociceptivas induzidas por processos inflamatórios são inibidos pela capsazepina (antagonista do receptor TRPV1) (Davis, 2000; Caterina et al, 2002). Se essa modulação central das poliaminas sobre os receptores TRPV1 ocorrer, o mesmo efeito pode ser observado no SNP, no entanto esse papel das poliaminas periféricamente ainda permanece desconhecido, principalmente a dor relacionada a processos inflamatórios, como no caso das artrites.

Tanto o receptor NMDA quanto o TRPV1 são expressos no SNC e SNP, e modulam a transmissão de estímulos dolorosos (Mezey et al., 2000; Carlton et al., 2001; Calixto et al., 2005). Existem dois mecanismos que contribuem para a dor inflamatória, um desses fenômenos é a sensibilização periférica, um aumento da resposta pelos nociceptores, ou por uma sensibilização central, aumentando a transmissão sináptica na medula espinhal (Wang, 2005). Dentre os modelos de dor inflamatória, incluem-se aqueles em que são administrados mediadores inflamatórios ou substâncias químicas que provocam no organismo uma resposta imune. Uma substância bastante utilizada para o desenvolvimento de um processo inflamatório é o CFA, que quando injetado na pata ou articulações é usado como um modelo de artrite, desenvolvendo condições que podem ser associadas àquelas vistas em pacientes com artrite (da Silva Filho et al., 2004; Whiteside et al., 2005).

4.2. Dor relacionada à inflamação

A dor tem sido um dos principais sintomas clínicos que levam os indivíduos a procurar serviços primários de saúde. Embora a dor seja uma resposta que alerta os indivíduos para a ocorrência de alterações na integridade e na funcionalidade do organismo, permitindo que mecanismos de defesa ou de fuga sejam adotados, ela também gera consequências desagradáveis tais como, sofrimento, estresse, prejuízo nas relações sociais e econômicas (ex: isolamento social, ausência no trabalho), tornando-se um problema que deve ser rapidamente e efetivamente tratado (Brenann et al., 2007).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual presente real ou potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (Loeser e Treede, 2008). Além disso, a percepção da dor é bastante complexa, já que não envolve apenas a transmissão de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (Julius Basbaum, 2001). Sabe-se também que a dor, além de ser uma sensação é uma experiência, onde as sensações possuem vias neuroanatômicas importantes como receptores específicos que permitem a detecção e intensidade de um estímulo. As experiências incorporam os componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (Julius e Basbaum, 2001). A sensação de dor serve como um alerta ao indivíduo, como também desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo, desta forma, a dor eminente aguda possui grande valor adaptativo relacionado com a sobrevivência (Millan, 1999).

O componente sensorial da dor (nocicepção) é o componente capaz de descrever os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos, o qual é formado por várias vias que ligam diversos componentes do sistema nervoso de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como o calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas, ativam as terminações nervosas livres periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores (Loeser e Treede, 2008). Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DGR), trigeminal (TG) e nodoso, os quais conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal, núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte e núcleo

do trato solitário, respectivamente (Dray e Perkins, 1997; Russo e Brose, 1998; Besson, 1999; Hayakawa, 2009). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo que está ameaçada (Watkins e Maier, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativas) e afetivas/motivacionais (descontentamento) da dor (Hunt e Mantyh, 2001; Craig, 2003). Os neurônios de segunda ordem formam vias supraespinhais, sendo as mais importantes as vias espinotalâmica e a espinoparabraquial. A via espinotalâmica termina no tálamo ventroposterior e ventrobasal, que tem projeções para o córtex e a via espinoparabraquial termina no núcleo parabraquial e têm projeções para o hipotálamo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (Hunt e Mantyh, 2001; Craig, 2003). Esta percepção supraespinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa (Watkins e Maier, 2002; Craig, 2003).

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias, a dor associada com a artrite (Ashburn e Staats, 1999). Durante estas síndromes, o processamento sensorial é anormal; e os estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente e sem necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou choque (Loeser e Treede, 2008). A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (Besson, 1999; Woolf e Mannion, 1999; Marchand et al., 2005).

A dor crônica está associada com dano tecidual, inflamação ou neuropatologias que conduzem a modificações na sensibilidade da nocicepção, alterando a relação entre o estímulo e a resposta e afetando a modulação do estado doloroso resultante. Alguns desses eventos ocorrem em intervalos de tempo precisos durante o desenvolvimento e a consolidação do estado doloroso anormal, levando a mudanças desde a excitabilidade das fibras aferentes primárias, até alterações drásticas no fenótipo celular dessas fibras e expressão de novas moléculas (tais como neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores). Mudanças estruturais podem incluir: perda de interneurônios espinhais, rearranjos inapropriados de processos nervosos aferentes na medula espinhal, e a proliferação de fibras simpáticas nos gânglios sensoriais. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras aferentes e da participação do sistema imune (Dray et al., 1994).

Tanto células residentes no sítio da lesão (como fibroblastos, células de Schwann, queratinócitos e mastócitos) quanto leucócitos recrutados para a região (como neutrófilos, macrófagos e linfócitos) podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais. Essa sensibilização está bastante envolvida com dores crônicas associadas com processos inflamatórios (como as artrites) (Bennett, 1999; Tracey e Walker, 1995).

4.3. Papel das poliaminas na dor

As poliaminas estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo o controle da excitabilidade neuronal (Rubin et al., 2001; Kusano et al., 2008). Este controle é exercido devido à capacidade das poliaminas modularem canais iônicos, como o glutamatérgico NMDA e o receptor vanilóide TRPV1, importantes no desenvolvimento e processamento da dor (Bowie e Mayer, 1995; Johnson, 1996; Ahern et al., 2006; Kusano et al., 2008).

Tao-No e colaboradores (2000) demonstraram que a administração i.t de espermina foi capaz de produzir respostas comportamentais, como morder, lamben e coçar em camundongos. Além disso, foi observado que esses efeitos foram inibidos tanto pela administração intraperitoneal de morfina, ou pela co-administração via i.t de ifenprodil (antagonista competitivo do sítio das poliaminas) com o ácido D(-)-2-amino-5-fosfonoalérgico, e também pelo antagonista do receptor NMDA (MK-801).

Outros dados semelhantes foram observados por Kolhekar e colaboradores (1994), que observaram que a administração de espermina mediado pelo sítio das poliaminas produziu hiperalgesia em ratos no teste de retirada da cauda, e que também foi antagonizada pelo MK-801.

Estebe e colaboradores (2006) observaram que a dieta pobre em poliaminas, também teve um efeito analgésico na hiperalgesia mecânica desenvolvida pela injeção de carragenina, que assim como o CFA possui um efeito de desenvolver uma resposta inflamatória. Além disso, Rivat e colaboradores (2008) mostraram que dietas pobres em poliaminas foram capazes de amenizar os efeitos dolorosos causados por formas de dores crônicas, como no caso das monoartrites e também em neuropatias, além de prevenir a hipersensibilidade duradoura causada pelo tratamento com opióides. Adicionalmente, essa dieta também foi eficiente em prevenir o aumento da fosforilação da tirosina presente na subunidade NR2B do receptor NMDA, o qual está envolvido no desenvolvimento e duração da hiperalgesia inflamatória.

Como a dieta, trabalhos como o desenvolvido por Wolos e colaboradores (1989), demonstraram que o uso de putrescina metilacetilênico (inibidor da biossíntese de poliaminas) foi capaz de prevenir o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos. Assim, tanto a dieta pobre em poliaminas, quanto à inibição da síntese de poliaminas sugerem um importante papel das poliaminas endógenas em processos nociceptivos.

Além disso, Chakradhar e colaboradores (2007) demonstraram que ratos injetados com carragenina e que desenvolveram uma inflamação aguda, apresentaram um aumento dos níveis de poliaminas após 24 horas e que esse aumento não foi após o pico de formação de edema. Similarmente, em ratos injetados com CFA (inflamação crônica) houve também um aumento significativo dos níveis de poliaminas comparado com os animais do grupo controle, e que esse aumento dos níveis de poliaminas observado foi acompanhado com um aumento nos níveis de proteína e DNA. Quando os animais foram expostos ao tratamento com diclofenaco e valdecoxibe (antiinflamatórios não-esteroidais), houve uma redução dos níveis de poliaminas, proteína e DNA, uma vez que o tratamento com dexametasona aumentou a putrescina, no entanto causando uma inibição dos níveis de proteína e DNA. Isso sugere um possível envolvimento das poliaminas tanto na regeneração do tecido inflamado, o que seria observado no caso de uma inflamação

aguda, como também um possível envolvimento formação de fibrose tecidual, quando em um processo de inflamação crônica. E que as drogas não-esteroidais modulariam negativamente as poliaminas, sendo pela indução de espermidina/espermina acetiltransferase ou pela inibição da ODC.

Níveis aumentados de poliaminas também foram encontrados por Furumitsu e colaboradores (1993), no entanto, em amostras de urina de pacientes com artrite reumatóide. Foram observados níveis aumentados de poliaminas nessas amostras, sendo que, esses níveis foram maiores em pacientes com artrite reumatóide do que os pacientes com osteoartrite. Além disso, os níveis de poliaminas tiveram uma correlação positiva com os níveis de proteína C reativa, o que sugere mais uma vez o papel das poliaminas na atividade da doença. Resultados semelhantes foram observados por Yukioka e colaboradores (1992), onde níveis aumentados de poliaminas em tecidos e fluídos sinovial em pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite, artrite pós-traumática e artrite infecciosa, o que reforça ainda mais a ideia de que as poliaminas estão envolvidas nesses processos inflamatórios.

Devido aos tratamentos usados para aliviar a dor causada pela artrite serem limitados pela apresentação de efeitos colaterais, e por não serem suficientemente efetivos (Milano et al., 2008), e pelas poliaminas parecerem possuir um envolvimento nesses processos dos mecanismos de tais desordens, o papel das poliaminas deve ser melhor compreendido, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos limitadas por efeitos inespecíficos indesejáveis.

ROLE OF PERIPHERAL POLYAMINES IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PAIN

Mariane A. Silva^a, Jonatas Z. Klafke^a, Mateus F. Rossato^a, Camila Gewehr^b, Gustavo P. Guerra^a, Maribel A. Rubin^{a,b}, Juliano Ferreira^{a,b}*

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica,

^bPrograma de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química, Cidade Universitária, Avenida Roraima, 1000, Camobi, 97105 900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8053; fax +55 55 3220 8756. E-mail addresses:

ferreiraj99@gmail.com

ABSTRACT

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are aliphatic amines produced by the action of ornithine decarboxylase (ODC), a rate-limiting and protein kinase C (PKC)-regulated step in polyamine synthesis. Since the levels of polyamines were found to be high in synovial fluid of arthritic patients, the aim of the present study was to identify the role of peripherally produced polyamines in the model of inflammatory pain induced by adjuvant arthritis. The subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant (CFA, 50 μ L/paw) caused the development of mechanical allodynia and edema. Moreover, it increased ODC expression and activity as well as PKC activation. The previous administration of the selective ODC inhibitor DFMO (10 μ mol/paw) was capable of preventing the development of allodynia and edema as well as the increase in ODC activity produced by CFA injection. Furthermore, the previous administration of the PKC inhibitor GF109203X (1 nmol/paw) reduced allodynia and the increase of ODC activity in animals injected with CFA. Accordingly with the synthesis inhibition, we have observed that subcutaneous injection of putrescine (10 μ mol/paw), spermidine (3-10 μ mol/paw) or spermine (0.3-3 μ mol/paw) into the rat paw also caused mechanical allodynia and edema. The present results suggest that endogenously synthesized polyamines are involved in the development of nociception and edema caused by the adjuvant. Moreover, the polyamine production in inflammatory site seems to be related with the increase in ODC activity stimulated by PKC activation. Thus, the control of polyamine synthesis and action could be an interesting target to control inflammatory pain.

Key words: arthritis; DFMO; edema; inflammation; ODC.

1. INTRODUCTION

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are ubiquitous and small aliphatic amines present in almost all cells ^[1]. Putrescine is formed from the decarboxylation of ornithine by ornithine decarboxylase (ODC; E.C 4.1.1.17), a rate-limiting step in polyamine synthesis ^[2, 3]. Putrescine is converted into spermidine by spermidine synthase and into spermine by spermine synthase, which are two aminopropyl transferases ^[1, 2]. ODC is a protein with short half-life (10 min-1 hour in mammalian) and its activity and expression are highly regulated by the availability of polyamines and by protein kinase C (PKC) ^[4, 5, 6]. Besides endogenous synthesis, an exogenous supply of polyamines is provided by dietary intake and by intestinal absorption from the products of bacterial metabolism ^[7].

Polyamines are involved in several biological processes, including the control of neuronal excitability and the improvement of memory and learning in the central nervous system ^[1, 8]. Previous studies have been showed that polyamine deficient diet plus an antibiotic (to reduce the level of microflora-derived polyamines) relieves the hyperalgesia induced by incision, inflammation or neuropathy in rats, an effect that seems to be mediated by NMDA receptors in spinal cord ^[9, 10]. Accordingly, some studies have shown that spinally (by intrathecal route) administered spermine produced nociceptive behavior in rodents ^[11, 12]. Apart their pro-nociceptive action at the spinal cord, the role of peripheral polyamines in pain is unknown.

Interestingly, increased levels of polyamines are found in tissue and synovial fluid from patients with osteoarthritis or rheumatoid, posttraumatic arthritis and infectious arthritis ^[13, 14, 15]. Moreover, it has been demonstrated that the activity and expression of ODC is increased in inflammatory tissue ^[16]. These findings indicate

that endogenously produced polyamines could take a role in inflammatory pain.

Therefore, the present study aimed to investigate the role of peripheral endogenous polyamines in nociception and edema in a rat model of arthritis induced by the adjuvant.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

Experiments were performed on adult male Wistar rats (weight 250-300 g) bred in our animal house. The animals were housed at controlled temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) with a 12 h light /dark cycle and with standard lab food and water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room for at least 30 min before the experiments. The experiments reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals^[17]. The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments. This study was approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our university (no. 23081.012331/2009-81).

2.2 Drugs and treatments

The following drugs and chemicals were used: putrescine, spermidine, spermine, DL- α -difluoromethylornithine-hydrochloride hydrate (DFMO), GF109203X, phosphate-buffered saline (PBS), and complete Freund's Adjuvant (CFA; 1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannide monooleate); all obtained from Sigma (St. Louis, USA). The solutions of the drugs were prepared in PBS, except GF109203X, which was prepared with 0.1% of dimethyl sulphoxide (DMSO).

To assess the role of peripheral endogenous polyamines or of the PKC activation in inflammatory pain, a 50 μl volume of CFA was administered

subcutaneously (s.c) under the plantar surface of the right hind paw and a separate group of animals received an s.c injection of the appropriated vehicle (PBS). Different groups of animals were also subcutaneously pre-injected with the selective ODC inhibitor DFMO (0.3-10 $\mu\text{mol/paw}$) or PKC inhibitor GF109203X (1 nmol/paw) 1 h before CFA. Higher doses of these drugs were not used because of their solubility limit.

To verify if exogenously administered polyamines are capable of producing nociception or edema, a 50 μl volume of putrescine, spermine or spermidine (0.003-10 $\mu\text{mol/paw}$) was also administered subcutaneously (s.c) under the plantar surface of the right hind paw and a separate group of animals received an s.c injection of the appropriated vehicle (PBS). Higher doses of polyamines were not used because they elicited spontaneous nociception, which makes the measurement of nociception difficult.

The effect of drugs on nociception and edema was assessed from 0.5 up to 24 h after the administration of drugs. The dose and the time of administration of the drugs were based on pilot studies and on literature data ^[18].

2.3 Nociception assessment

Mechanical allodynia was measured as described previously by Chaplan (1994) and was considered as indicative of nociception. Rats were placed individually in clear Plexiglas boxes (9x7x11 cm) on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the hind paws. The paw was touched with one of a series of seven von Frey hairs (6-100 g). The von Frey hairs were applied perpendicular to the plantar surface with sufficient force to cause slight buckling

against the paw, and held for approximately 2 s. The 50% withdrawal threshold was determined using the up-and-down method of Dixon (1980). In this paradigm, testing was initiated with the 15 g hair. Stimuli were always presented consecutively, whether ascending or descending. Withdrawal thresholds were verified at several time-points after polyamines or CFA injection (from 0.5 up to 24 h) compared with baseline values (before drug administration).

2.4 Edema formation assessment

The edema induced by different agents was considered as an increase in paw thickness, measured by a digital caliper (Mytutoio, Japan) as described previously by Milano et al. (2008). Paw thickness was verified at several time-points after polyamines or CFA injection (from 0.5 up to 24 h) compared with baseline values (before drug administration).

2.5 ODC activity

After behavioral observation, paw skin samples proximal to the point of injection were collected to perform ODC activity analysis according to Tahib (1998), with minor modifications. The sample was homogenized in buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing, 2.5 mM DL-dithiothreitol (DTT) and 0.1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Following 10 min of incubation at 4° C, the homogenate was centrifuged at 35,000 xg for 45 min at 4° C and the supernatant was collected. The protein in supernatant was measured using the Bradford (1976) method. To perform the reaction, 200 µl (0.5 mg/mL of protein) of the supernatant

was added in assay buffer (1M Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM DTT, 2 mM pyridoxal phosphate, 20 mM L-ornithine, 0.1 m Ci/mL L-[1-¹⁴C]-ornithine) and the mixture was incubated at 37°C for 30 min in capped glass tubes. At the top of the tube a filter paper humidified was attached in 0.25 mL of 1 M hiamine hydroxide. Afterwards, 250 µL of 5 M sulphuric acid was added to the reaction, and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. After this period, the filter paper was collected for the measurement of ¹⁴CO₂ released from [¹⁴C]-ornithine. ODC activity was expressed as ¹⁴CO₂ % compared to the control group (PBS treated paws). The mean activity of ODC in the control group was 7.1 ± 0.7 pmol/min/mg protein.

2.6 ODC expression

We also performed western blot analysis to verify the expression of ODC protein in paw skin samples. The assay was carried out as described previously^[18] with minor modifications. The paw tissue was homogenized in a lyses buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.9, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaF, 10 mg/mL aprotinin, 1 M β-glycerolphosphate, 200 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 M DTT and 0.1 M of sodium orthovanadate. After centrifugation (13,000 xg for 30 min at 4°C), the supernatant containing the cytosolic fraction was collected. The protein content was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard. Amounts of protein (70 µg) were mixed in load buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were separated in 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and transferred to polyvinilidene difluoride membranes according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer,

USA). Staining proteins on the PVDF membrane with a solution of 0.5% Ponceau S and 1% glacial acetic acid in water served as a loading control ^[24]. Afterwards, the membranes were dried, scanned and quantified with Scion Image PC version of Macintosh compatible NIH image. Then, the membranes were washed, blocked with 1% BSA in TBS-T (0.05% Tween 20 in Tris-borate saline) and incubated for 10 min with diluted (1:150) primary antibodies against ODC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were processed using a SNAP i.d. system (Millipore, USA). Blots were washed three times with TBS-T followed by incubation with alkaline phosphatase-coupled secondary antibody (1:3000) for 10 min. The protein bands were visualized with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium system (BCIP/NBT). The membranes were dried, scanned and quantified again, and the ODC western blot had a faint background that was corrected in the image analysis.

2.7 PKC activation

Once phospho-PKC is the catalytically active form of PKC ^[25], we performed western blot analysis from paw skin samples to observe possible changes in PKC activation (verified as an increase on the detection of both the phosphorylated form of PKC and the relation between phosphorylated and total forms of PKC) after administration of drugs. The method was similar to that described previously in Kassuya et al. (2005) with some modifications. For PKC activation, the samples (70 µg the protein) were incubated for 10 min, with 1:150 dilutions of primary antibodies to PKC and phospho-PKC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After this, the protein bands were visualized with BCIP/NBT system. The membranes were

dried, scanned and quantified with Scion Image PC version of Macintosh compatible NIH image. The PKC western blot had a faint background that was corrected for the image analysis.

2.8 Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. Student's t test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) were used to analyze the statistical significance of differences among groups followed by Bonferroni's or Student-Newman-Keuls' (SNK) post hoc tests. The level of significance was set at $P < 0.05$ and F values demonstrated treatment versus time interactions. The values of ED_{50} (i.e. dose of drug necessary to produce 50% of the nociceptive response relative to the maximum effect), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits using the program GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA) E_{max} (maximal effect) and I_{max} (maximal inhibition), were calculated based on responses of the control group. In order to meet ANOVA assumptions, mechanical allodynia data were subjected to Log transformation before statistical analysis.

3. RESULTS

3.1 Effects of endogenous polyamine production on mechanical allodynia and paw edema of rats with adjuvant arthritis

To investigate the role of endogenous polyamines in mechanical allodynia and edema, we tested the effect of the selective ODC inhibitor DFMO in CFA-induced inflammation. We observed a decreased mechanical threshold (mechanical

allodynia) and increased paw thickness (paw edema) from 0.5 to 24 h after s.c. administration of CFA (50 μ l/paw) compared with baseline values (Figure 1A and C). The pre-treatment with DFMO s.c (10 μ mol/paw) reduced the mechanical allodynia induced by CFA significantly from 4 h to 24 h compared with the vehicle group [F (1,23) = 4.136, P<0.0008]. The maximal inhibition (I_{max}) observed 4 h after administration was $29\pm 5\%$ with the dose of 10 μ mol/paw (Figure 1A and B). Moreover, we also observed that DFMO prevented the edema formation induced by CFA injection [F (1,23) = 6.440, P<0.0001]. The most pronounced effect was observed 6 h after treatment of CFA when the I_{max} of $28\pm 4\%$ was obtained (Figure 1C and D).

Please, insert figure 1 here

3.2 Effects of exogenously administered polyamines on mechanical allodynia and edema in non-arthritic rats

After observing that the inhibition of endogenous synthesis reduced inflammatory pain in arthritic rats, we tested the ability of polyamines to induce nociception and edema in non-arthritic rats. Peripheral s.c. administration of putrescine (10 μ mol/paw), spermidine (10 μ mol/paw) or spermine (1 μ mol/paw) caused a mechanical allodynia starting at 0.5, 1 and 0.5 h after injection and persisting until 6, 4 and 4 h, respectively (Figure 2A-C). The peak effect for mechanical allodynia was observed at 2, 1 and 2 h after injection for putrescine, spermidine or spermine, with respective maximal effect (E_{max}) of 39 ± 5 , 65 ± 10 and 43 ± 9 % of mechanical threshold decreasing compared with the control group (Figure 2). The calculated ED_{50} values for this nociceptive effect were 0.8 (0.4-1.8) and 0.004 (0.001-0.026) μ mol/paw for spermidine and spermine, respectively (Figure 2D and

F). Since the allodynia induced by putrescine was not dose dependent, the ED₅₀ values were not calculated for this polyamine (Figure 2B).

Similar to nociception, s.c. administration of putrescine (10 µmol/paw), spermidine (10 µmol/paw) or spermine (1 µmol/paw) also induced paw edema formation starting at 0.5 h after injection and persisting until 6 h, for all polyamines (Figure 3A-C). The peak effect for edema was also observed at 0.5 h after injection for all polyamines, with maximal effect (E_{max}) of 25±4, 35±3 or 25±4 % of increase in paw thickness compared with the control group for putrescine, spermidine or spermine, respectively (Figure 3). The calculated ED₅₀ values for the edematogenic action were 1.7 (0.8-3.7) and 0.027 (0.006-0.108) µmol/paw for spermidine and spermine, respectively (Figure 3D and F). Moreover, similar to nociception, the edema induced by putrescine was not dose dependent and thus the ED₅₀ values were not calculated (Figure 3B).

Please, insert figure 2 and 3 here

3.3 ODC expression and activity in inflamed tissue in rats with adjuvant arthritis

Since we observed that the inhibition of polyamine synthesis reduced inflammatory pain, we directly evaluated the ODC activity after CFA injection. When compared with vehicle-treated rats, we observed that CFA significantly increased the ODC activity at 4 h (38±5%) and 6 h (50±15%) after injection (Figure 4A). Moreover, we verified that the dose of DFMO (10 µmol/paw) able to reduce CFA-induced nociception and edema was also effective in fully prevent the increase of ODC activity caused by CFA (Figure 4B). DFMO (10 µmol/paw) pre-treatment also reduced (in 33±9%) the baseline activity of ODC in vehicle treated animals (Figure 4B).

Once ODC activity could be altered by its up-regulation, we also observed the effect of adjuvant arthritis in ODC expression. We observed that CFA injection increases the ODC protein expression 2, 4 and 6 h after CFA injection compared to the PBS group (Figure 5A-B).

Please, insert figure 4 and 5 here

3.4 Effect of PKC activation on allodynia, edema and increased ODC activity induced by CFA injection

Firstly, we measured the changes in PKC activation in the CFA-induced inflammation. We observed that CFA significantly increased the detection of phosphorylated form of PKC α and the relation between phosphorylated and total forms of PKC α 4 h after its injection as well as decreased the total form of PKC α after 6 h (Figure 6A - E). Moreover, we assessed the effect of GF109203X, a selective PKC inhibitor, on mechanical allodynia, paw edema and on the increase of ODC activity induced by CFA. We observed that the administration of GF109203X (1 nmol/paw) reduced the mechanical allodynia, but not paw edema, induced by CFA in 4 h [F (1,5) = 6.208, P<0.05], with an inhibition of 74 \pm 4% compared with the vehicle group (Figure 7A and B). It was also observed that GF109203X was able to totally prevent the increase on ODC activity in CFA-injected rats, without changing the ODC activity in PBS treated animals (Figure 8).

Please, insert figure 6, 7 and 8 here

4. DISCUSSION

Polyamines are ubiquitous and aliphatic amines involved in several biological processes. Here we have shown that the peripheral polyamines are related with the

induction of inflammatory pain since the reduction of endogenous polyamine production by ODC inhibition decreased the nociception and edema related with arthritis. Moreover, the injection of exogenous polyamines caused nociception and edema, and the activity and expression of ODC is increased in inflammatory tissue. We also demonstrated that the action of PKC is related with the increased activity of ODC as well as with nociception and edema production.

It is known that CFA produces a condition of chronic inflammation in rodents and it is used as a laboratory model of arthritic pain ^[14]. In the present study, we have shown that subcutaneous administration of the ornithine decarboxylase inhibitor DFMO had a long-lasting antinociceptive effect on the mechanical allodynia induced by CFA in rats. Our results are in accordance with previous findings that have showed that polyamine deficient diet relieves the hyperalgesia induced by inflammation in rats ^[9, 10]. Thus, both the restriction of polyamines ingestion and the inhibition of polyamine synthesis could be strategies for the improvement of treatment of inflammatory pain.

Of note, several clinical studies have demonstrated a critical role of polyamines in arthritis. Increased levels of polyamine are found in synovial fluid, synovial, urine and lymphocytes of arthritic patients and seem to be related to the activity and progression of the disease ^[15, 27, 28]. Furthermore, the anti-arthritic effect of methotrexate seems to be associated with its ability to reduce polyamine levels ^[28, 29]. There are also increased levels of polyamines in the paw of rats injected with CFA ^[30]. Confirming the idea that peripheral polyamine functions as pro-nociceptive agents, we have shown that the administration of exogenous polyamines induced mechanical allodynia when injected into the rat paw. In accordance, it was previously demonstrated that intrathecally injected spermine produced nociceptive behaviors in

rodents ^[11, 12]. Thus, similar to spinal cord, peripheral polyamines produced in inflamed tissue also seem to have pro-nociceptive action.

Suggesting that the doses of polyamines used in our study to cause nociception may be found in inflamed tissues, the concentration of the solution of spermine injected (0.3-10 mM to generate the doses of 0.03-1 $\mu\text{mol/paw}$) into the rat paw is in the same range of the spermine concentration in synovial tissue of arthritic patients (about 0.3 mM) or in paw tissue of CFA-injected rats (about 400 mM) ^[15,30].

Furthermore, we have found that the potency, but not the efficacy of polyamines to induce allodynia seems to be dependent on their charge, since spermine, which is the most charged polyamine, was more potent than putrescine in producing nociception. It has been described that some actions of polyamine, such as the interaction of ion channel, are charge-dependent ^[31]. The exact target, whose peripheral polyamine interacts to produce nociception, is still unknown; however, in spinal cord the glutamate NMDA receptor is an important target ^[11,12]. There are also NMDA receptors in peripheral terminals of nociceptors, which once stimulated by glutamate induce nociception in rodents ^[32]. Moreover, polyamines may also stimulate the vanilloid TRPV1 receptor that could trigger nociceptor activation ^[31]. However, the exact mechanism(s) responsible for the nociceptive effect induced by polyamine remains to be studied.

During inflammatory processes, it is possible to observe other events, such as edema and nociception. Similar to the nociceptive behavior, we showed that polyamine injection induced edema formation, being spermine the most potent polyamine tested. In addition, our study also showed that DFMO treatment was capable of reducing paw edema induced by CFA. In accordance with our findings, it

has been described that DFMO treatment reduced the edema produced by lung or brain injury ^[33, 34].

We also observed that CFA increased ODC activity and expression when compared with the control group. Moreover, DFMO, at a dose where it possesses anti-allodynic and anti-edematogenic effects, was able to reduce ODC activity in CFA-treated and control animals. ODC, the rate-limiting enzyme in polyamine biosynthesis, is very highly regulated and alterations in the activity are brought about by changes in the amount of ODC protein, which turns over very rapidly ^[6]. In fact, we detected that CFA increased the amount of ODC protein and the activity of ODC from 2 to 6 h after its injection. Thus, the increased ODC activity observed after CFA injection is, at least in part, related with the increase in the amount of protein.

ODC activity varies in response to many stimuli, demonstrating that PKC activity influences polyamine metabolism through a critical regulation of ODC activation at the levels of transcription, translocation and protein turnover ^[6, 35]. For example, the activity of ODC may be decreased by PKC depletion and increased by PKC over-expression ^[5]. Similar to what is found in the spinal cord of CFA-treated rodents ^[36], we also detected for the first time, at the best of our knowledge, an increase in the activation of PKC (detected as an increase of the phosphorylated form of PKC α and the relation between phosphorylated and total forms of PKC α) 4 h after CFA administration. This effect was not an unexpected finding, since the adjuvant injection increases the local level of several pro-nociceptive mediators that stimulate PKC, such as cytokines and nerve growth factor ^[37, 38]. We also detected a decrease in the total form of PKC α 6 h after CFA. This may be explained by the fact that phosphorylation of PKC α renders sensitive to degradation ^[25].

Indicating that PKC must be involved in polyamine-related inflammatory nociception, the inhibitor of PKC GF109203X significantly inhibited the increase of ODC activity and mechanical allodynia observed in adjuvant-injected animals, without altering ODC activity in control rats. Furthermore, as the PKC inhibitor was more effective than ODC inhibitor to reduce the mechanical allodynia caused by CFA, PKC seems to be other pro-nociceptive targets besides ODC to act. In fact, several ion channels and receptors can be modulated by PKC in sensory neurons to induce pain ^[38]. Different from allodynia, the PKC inhibition was not able to alter the edema from 0.5 to 24 h after CFA administration, which agrees with a previous study that demonstrates that PKC is not involved in the first phase (1 to 9 days) of CFA-induced edema in rats ^[39].

Taken together, the present results suggest that endogenously synthesized polyamines are involved in the development of nociception caused by the adjuvant. Moreover, the polyamine production in inflammatory site seems to be related with the increase in ODC activity stimulated by PKC activation. Thus, the control of polyamine synthesis and action could be an interesting target to control inflammatory pain.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto do Milênio, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Medicina Molecular. We thank CNPq and CAPES for the fellowship support.

REFERENCES

- [1]Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 2008;228:367-81.
- [2]Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:373-90.
- [3]Schipper RG, Verhosfstad AAJ. Distribution Patterns of ornithine Decarboxylase in Cells and Tissues: Facts, Problems, and Postulates. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1143-60.
- [4]Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J* 2003;376:1-14.
- [5]Zhao YJ, Zhang WH, Xu CQ, Li HZ, Wang LN, Li H, et al. Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts. *Mol Cell Biochem* 2009;332:135-44.
- [6]Pegg AE. Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 2006;281:14529-32.
- [7]Larqué E, Sabater-Molina M, Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition* 2007;23:87-95.
- [8]Rubin MA, Stiegemeier AJ, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Rafael LB et al. Intra-amygdala spermine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J. Pharmacol* 2001;423:35-9.

- [9]Estebe JP, Legay F, Gentili M, Wodey E, Leduc C, Ecoffey C, et al. An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. *Anesth Analg* 2006;102:1781-8.
- [10]Rivat C, Richebé P, Laboureyras E, Laulin JP, Havouis R, Noble F, et al. Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 2008;137:125-37.
- [11]Kolhekar R, Meller ST, Gebhart GF. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated changes in thermal nociception: allosteric modulation at glycine and polyamine recognition sites. *J Neurosci* 1994;63:925-36.
- [12]Tan-No K, Taira A, Wako K, Nijima F, Nakagawasai O, Tadano T, et al. Intrathecally administered spermine produces the scratching, biting and licking behaviour in mice. *Pain* 2000;86:55-61.
- [13]Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Rev* 2003;2:473-88.
- [14]Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain* 2007;28:3-8.
- [15]Yukioka K, Wakitani S, Yukioka M, Furumitsu Y, Shichikawa K, Ochi T, et al. Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992;19:689-92.
- [16]Pillai RB, Tolia V, Rabah R, Simpson PM, Vijesurier R, Lin CH. Increased colonic ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children. *Dig Dis Sci* 1999;44:1565-70.
- [17]Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.

- [18]Ferreira J, Trichés KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced peripheral protein kinase C activation in mice. *Pain* 2005; 117:171-81.
- [19]Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth* 1994;53:55–63.
- [20]Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–62.
- [21]Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluomethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci* 2008;83:739-46.
- [22]Tabib A. Determination of ornithine descarboxilase activity using [$^{14}\text{CO}_2$] ornithine. In. Morgan DML. *Polyamines Protocols. Methods in Molecular Biology* 1998;74:33-40.
- [23]Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976;72:248-54.
- [24]Calvo IR, Ocón B, Moya PM, Suárez MD, Zarzuelo A, Augustin OM, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 2010;401:318-20.
- [25]Ohno S, Konno Y, Akita Y. A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-

- regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J Biol Chem* 1990;265:6296-300.
- [26]Kassuya CAL, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol* 2007;150:727-37.
- [27]Furumitsu Y, Yukioka K, Kojima A. Levels of urinary polyamines in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993;20:1661-5.
- [28]Nesher G, Osborn TG, Moore TL. Effect of treatment with methotrexate, hydroxychloroquine, and prednisone on lymphocyte polyamine levels in rheumatoid arthritis: correlation with the clinical response and rheumatoid factor synthesis. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15:343-7.
- [29]Nesher G, Osborn TG, Moore TL. In vitro effects of methotrexate on polyamine levels in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:395-9.
- [30]Chakradhar LV, Naik SR. Polyamines in inflammation and their modulation by conventional anti-inflammatory drugs. *Indian J Exp Biol* 2007;45:649-53.
- [31]Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* 2006;281:8991-5.
- [32]Carlton SM. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:52-6.
- [33]Başkaya MK, Rao AM, Puckett L. Effect of difluoromethylornithine treatment on regional ornithine decarboxylase activity and edema formation after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 1996;13:85-92.

- [34]Olson JW, Atkinson JE, Hacker AD. Suppression of polyamine biosynthesis prevents monocrotaline-induced pulmonary edema and arterial medial thickening. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;81:91-9.
- [35]Shantz LM, Levin VA. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potencial. *Amino acids* 2007;33:213-23.
- [36]Cheng HT, Suzuki M, Hegarty DM. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 2008;155:948-58.
- [37]Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* 1997;121:417-24.
- [38]Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 2007;55:578-89.
- [39]Birchall AM, Bishop J, Bradshaw D. Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:922-9.

4.13. Figures

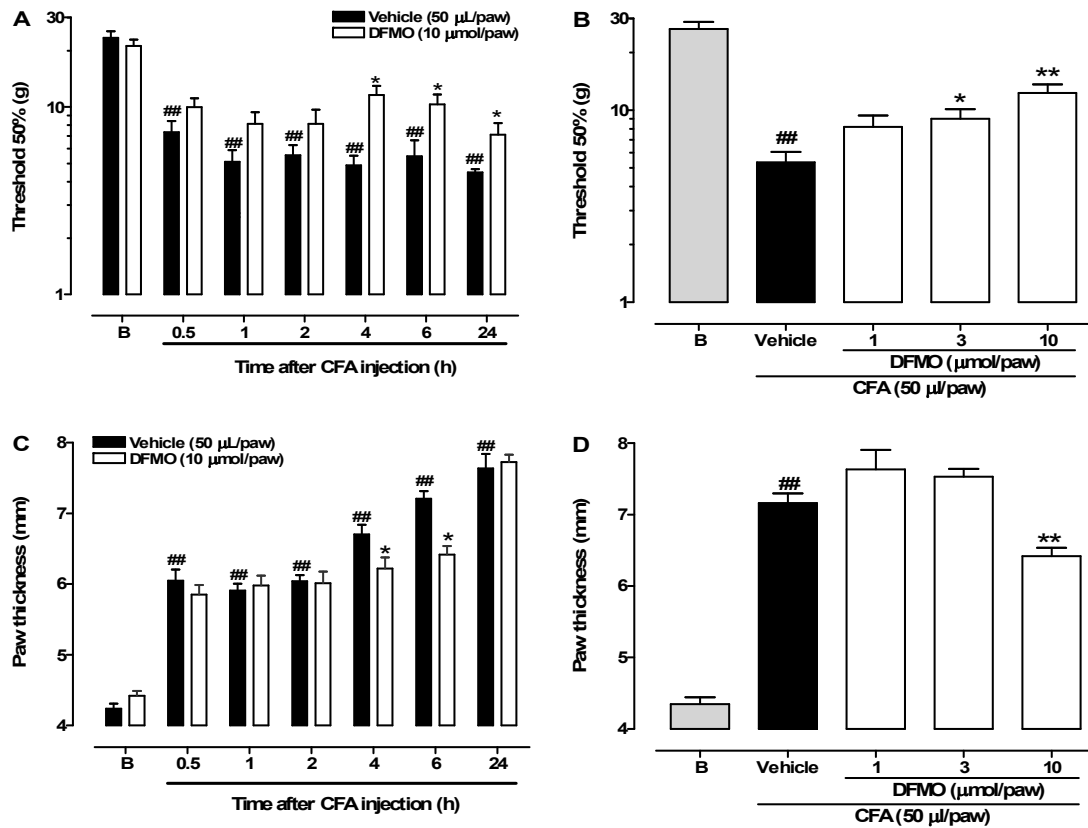


Figure 1. Time-courses (A and C) and dose-response curves (B and D) of the ODC inhibitor DFMO effects on mechanical allodynia (A and B) and paw edema (C and D) induced by CFA. The dose-response data for allodynia or edema were assessed 4 or 6 hours, respectively, after CFA injection. Data represents mean \pm SEM from 9 to 12 rats. ##P<0.01 and #P<0.05 compared with baseline (B) values; *P<0.05 and **P<0.01 compared with the vehicle group (one-way ANOVA followed by SNK test).

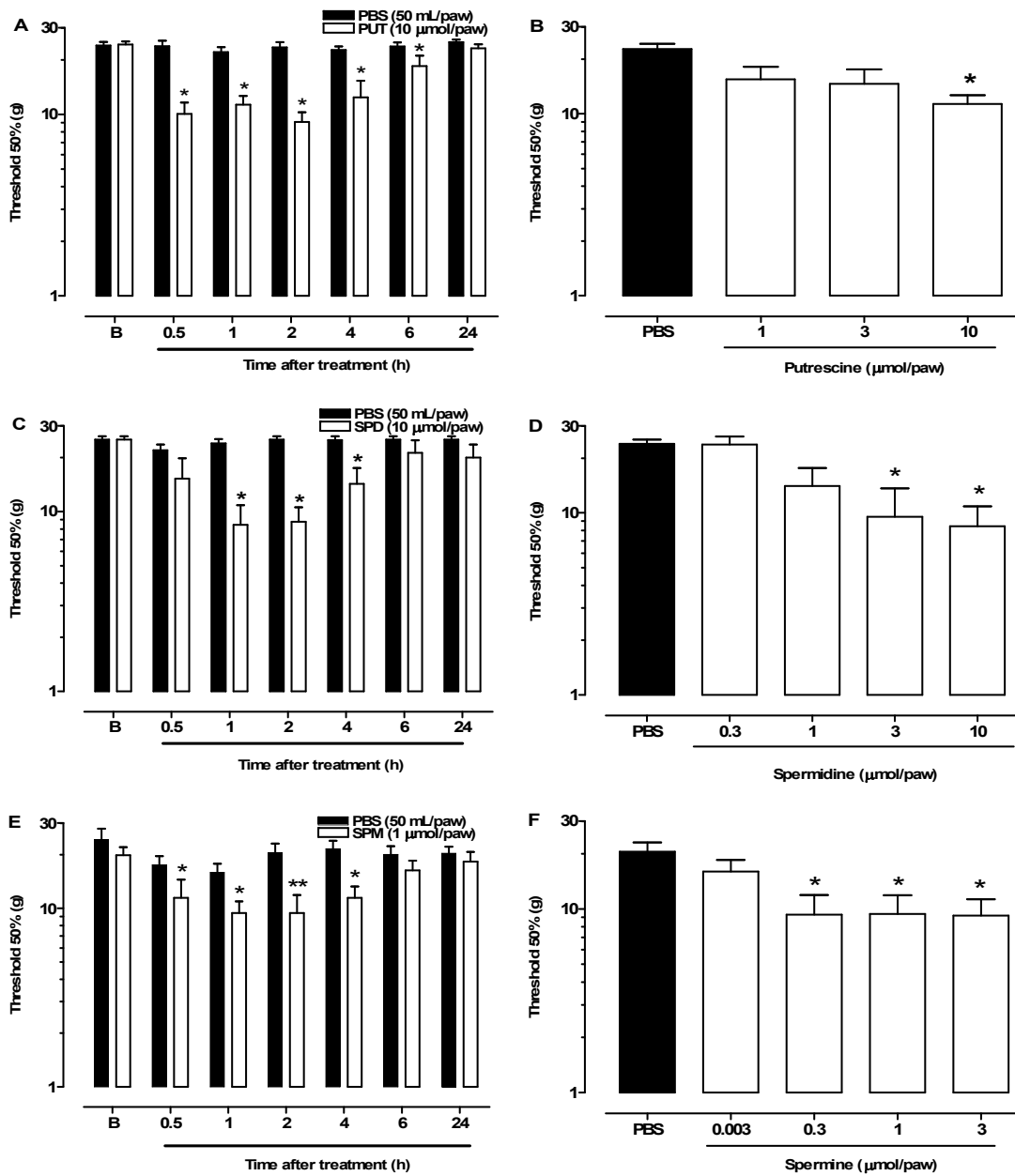


Figure 2. Time-courses (A, C and E) and dose-response curves (B, D and F) for the induction of mechanical allodynia in rats by peripheral injection of putrescine (PUT), spermidine (SPD) or spermine (SPM). Each data point represents mean \pm SEM from 7 rats for A and B, 5 rats for C and D and 9 rats for E and F. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicates statistically significant difference compared with vehicle (PBS) group (one-way ANOVA followed by SNK test).

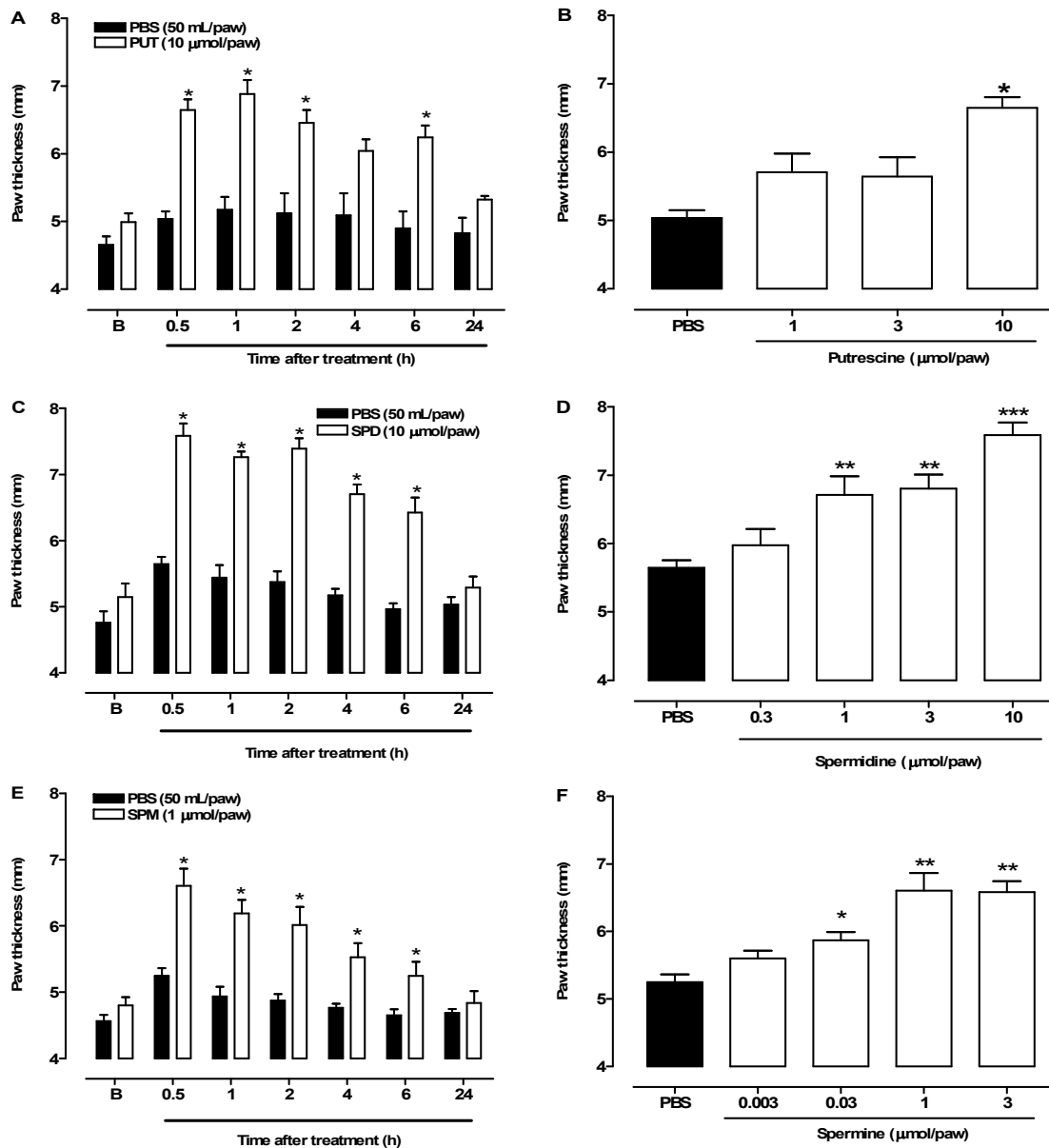


Figure 3. Time-courses (A, C and E) and dose-response curves (B, D and F) for the induction of paw edema in rats by peripheral injection of putrescine (PUT), spermidine (SPD) or spermine (SPM). Each data point represents mean ± SEM from 7 rats for A and B, 5 rats for C and D and 9 rats for E and F. *P < 0.05 and **P < 0.01 indicates statistically significant difference compared with vehicle (PBS) group (one-way ANOVA followed by SNK test).

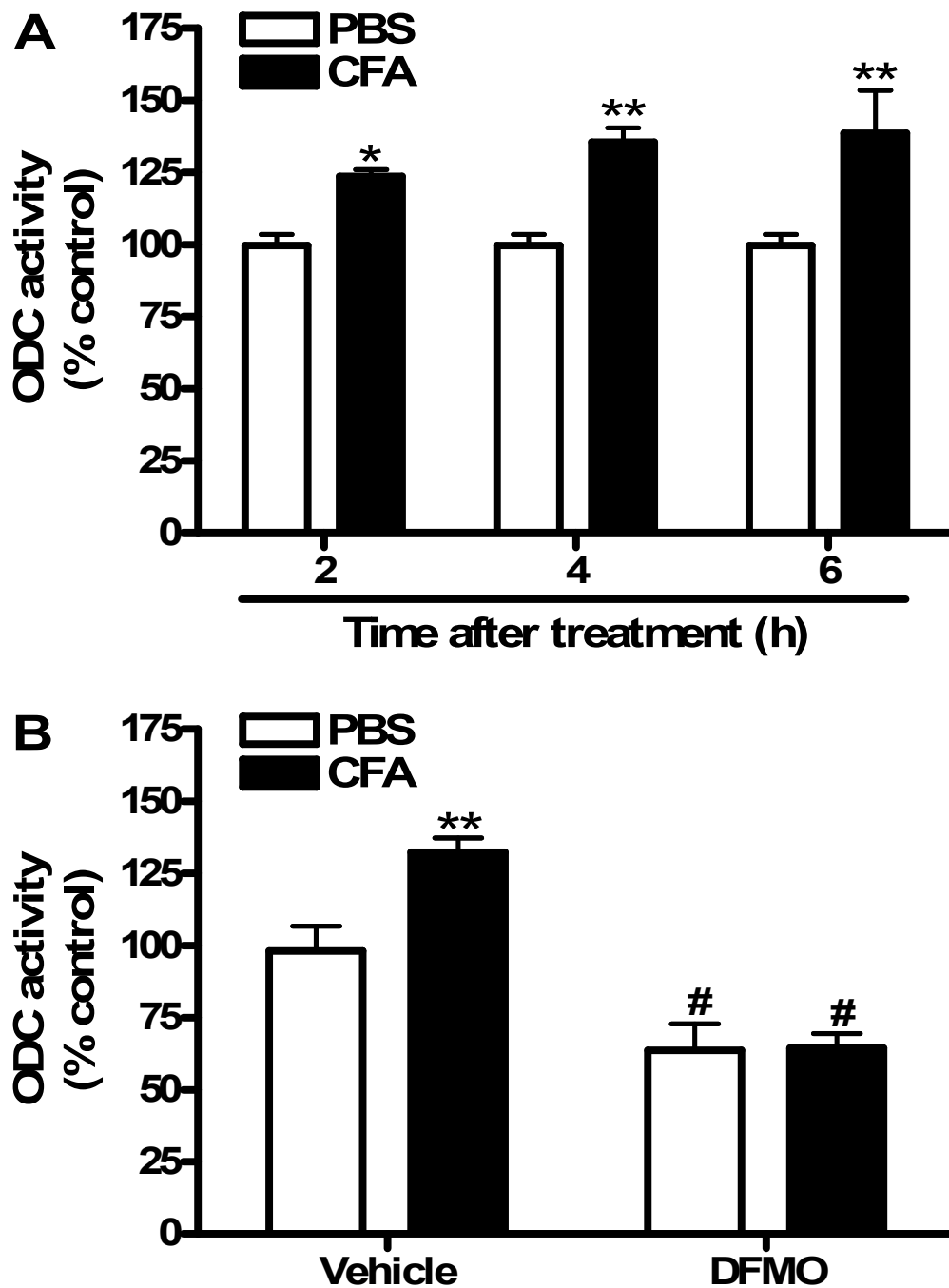


Figure 4. A) Effect of CFA on ODC activity in the injected tissue. B) Effect of the pre-treatment with DFMO or its vehicle on ODC activity in rats after 4 hours CFA or PBS. Data expressed mean \pm SEM from 6 rats. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significant when compared to PBS group, # $P < 0.05$ compared to vehicle-treated groups injected with CFA or PBS (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

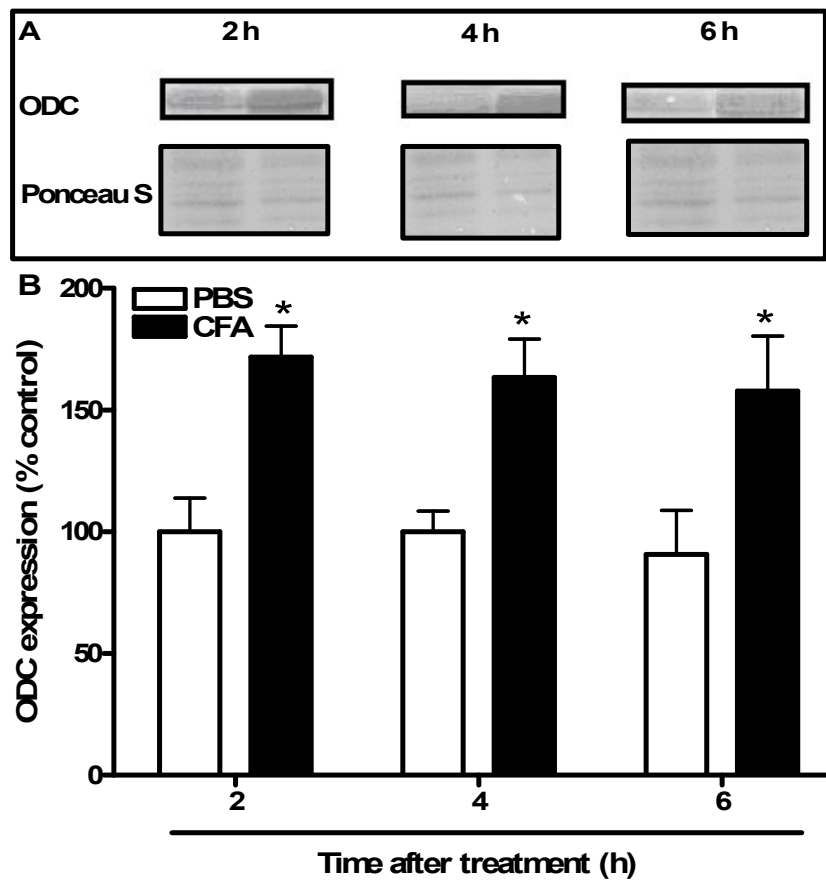


Figure 5. Effect of CFA on ODC protein expression in injected tissue. A) Western blot analysis of ODC expression in paw samples 2, 4 and 6 hours after injection of CFA or PBS. To demonstrate equal loading, a representative Ponceau S stained protein band is show. B) Quantification of the ODC protein expression. Data expressed mean \pm SEM from 4 to 6 rats. *P < 0.05 compared to control (one-way ANOVA followed by SNK test).

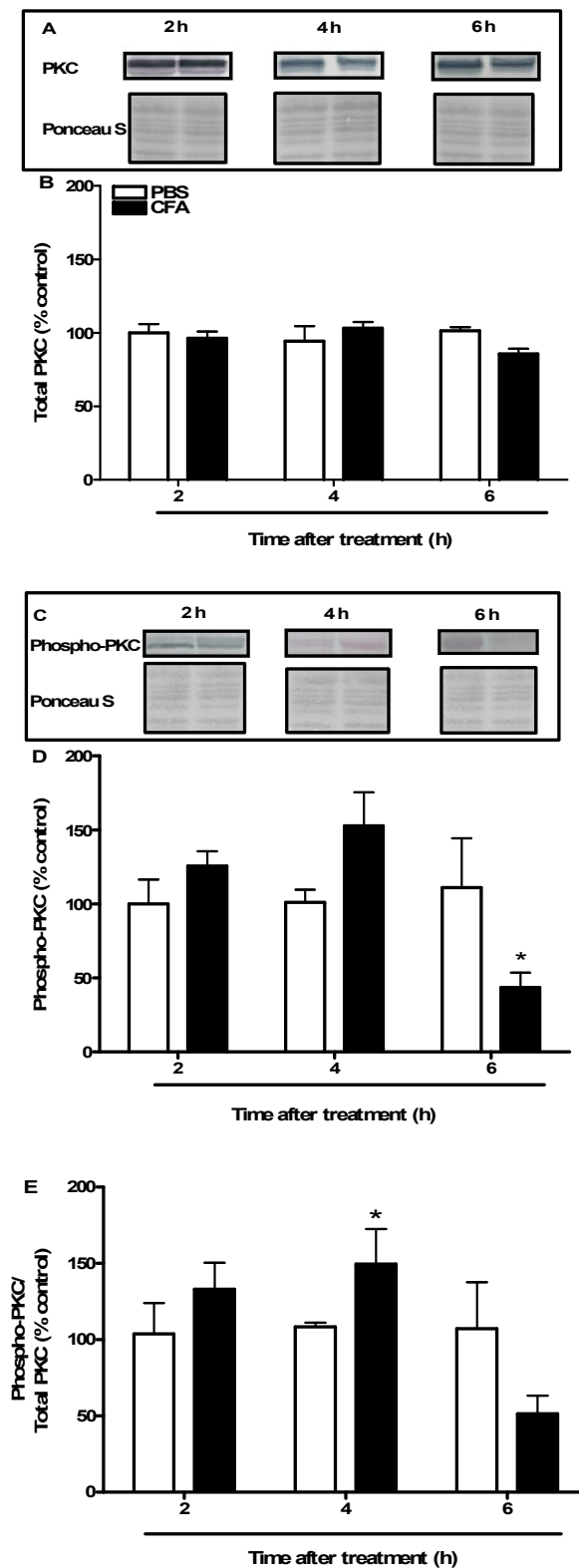


Figure 6. Effect of CFA on PKC activation assessed by the expression of total form and phosphorylated form, as well as, the relation in total and phosphorylated forms of PKC α . A) Western blot analysis of total form and (C) phosphorylated form of PKC α

expression in paw samples 2, 4 and 6 hours after injection of CFA or PBS. To demonstrate equal loading, a representative Ponceau S stained protein band is show. B) Quantification of the total form, (D) phosphorylated form (E), as well as, the relation in the total and phosphorylated forms of PKC α . Data expressed mean \pm SEM from 4 rats. *P< 0.05 compared to PBS injected rats (Student's t test).

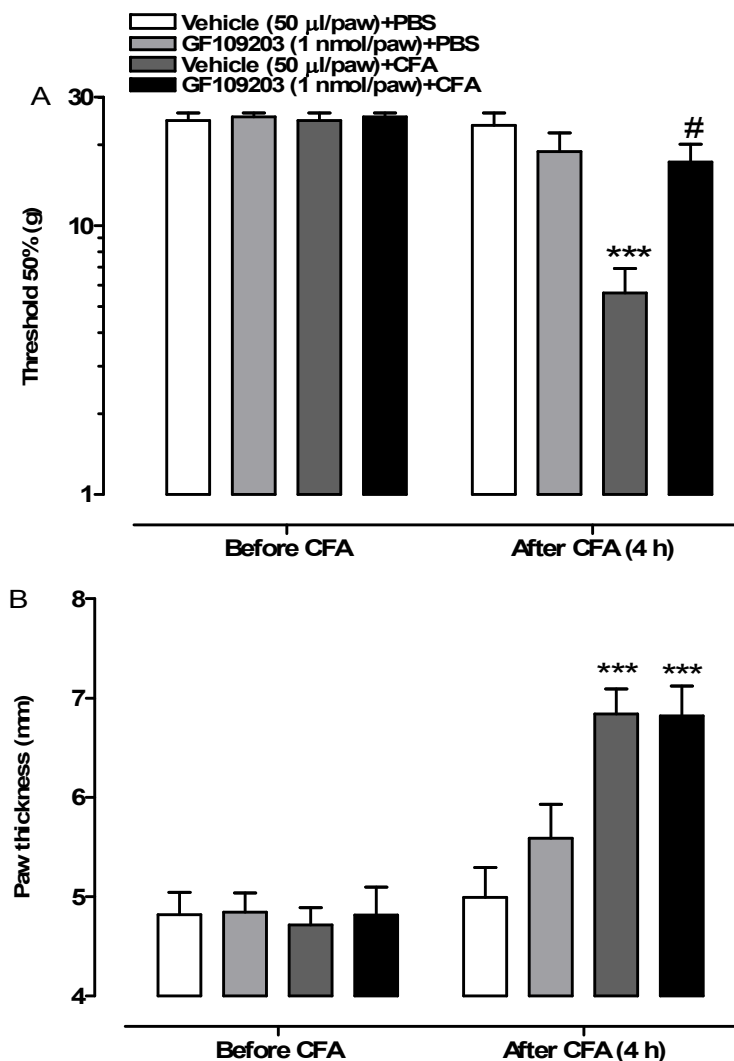


Figure 7. Effect of the pre-treatment with GF109203X on mechanical allodynia (A) and paw edema (B) assessed 4 hours after CFA. Data expressed mean \pm SEM from 5 rats. **P<0.01, significant when compared to vehicle plus PBS group, ###P<0.01 compared to vehicle plus CFA group (one-way ANOVA).

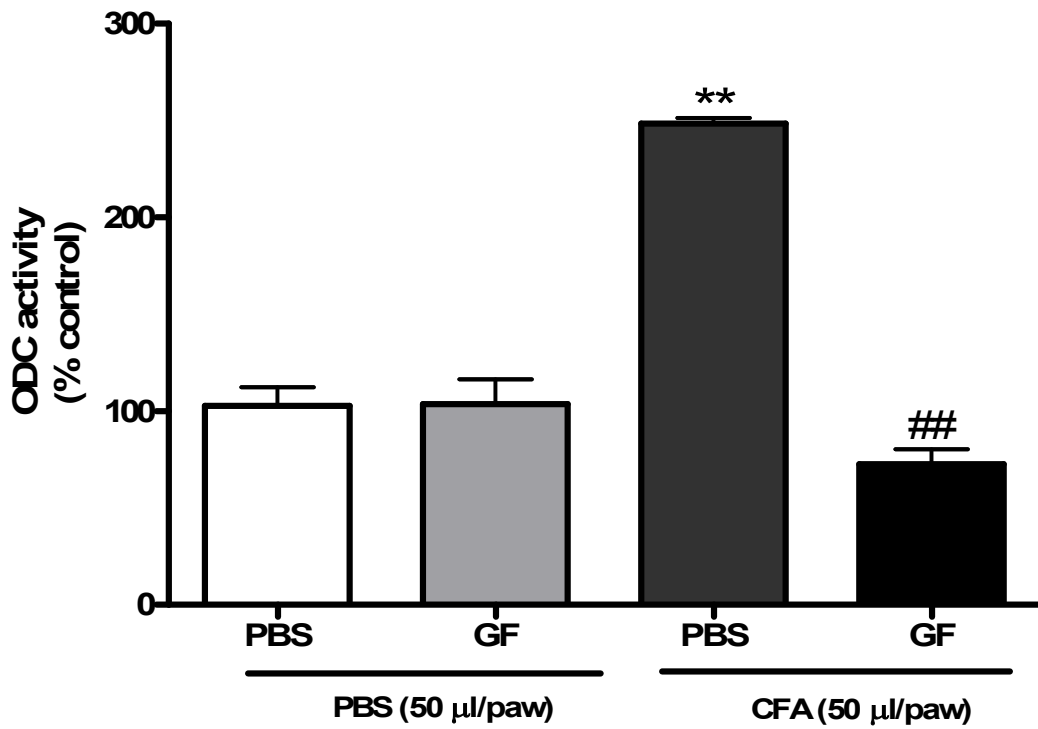


Figure 8. Effect of GF109203X on ODC activity of CFA or PBS-treated rats. Data expressed mean \pm SEM from 4 rats. **P<0.01, significant when compared to vehicle plus PBS group, ##P<0.01 compared to vehicle plus CFA group (one-way ANOVA).

Carta referente ao artigo revisado pelos autores, depois dos comentários dos revisores, e submetido novamente a revista

Fwd: Submission Confirmation for Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain

Sábado, 3 de Julho de 2010 14:33

De: "Juliano Ferreira" <ferreiraj99@gmail.com>

Para: "mariane_arnoldi" <mariane_arnoldi@yahoo.com.br>

----- Forwarded message -----

From: **Biochemical Pharmacology** <BP@kumc.edu>

Date: 2010/7/1

Subject: Submission Confirmation for Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain

To: ferreiraj99@gmail.com

Dear Dr. Ferreira,

This is to confirm your manuscript files have been submitted to the editorial office via the on-line system. You will receive further correspondence within the next few days.

Thank you for choosing Biochemical Pharmacology.

Kind regards,

Lynn LeCount
Managing Editor
Biochemical Pharmacology Editorial Office

Biochemical Pharmacology

Contact us
Help ?



» EES was upgraded on June 17.
[Read more about our new features.](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: ferreiraj99

Role: Author

Version: EE

Submissions Being Processed for Author Juliano Ferreira

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	BCP-D-10-00789	Role of peripheral polyamines in the development of inflammatory pain	01 Jul 2010	02 Jul 2010	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

6. DISCUSSÃO

As poliaminas são aminas alifáticas envolvidas em vários processos biológicos. No presente trabalho mostramos que as poliaminas periféricas estão relacionadas com a indução de dor inflamatória, na vez que a redução da produção de poliaminas endógenas através da inibição da ODC reduziu a nocicepção e edema relacionado com a artrite, e a injeção de poliaminas exógenas causou nocicepção e o edema, sendo também observado um aumento da atividade e expressão da ODC no tecido inflamado. Além disso, demonstramos que a ação da PKC está relacionada com o aumento da atividade da ODC, bem como com nocicepção e a produção de edema.

O CFA produz um estado de inflamação crônica em roedores e é usado em laboratórios como um modelo de dor relacionado à artrite (Neugebauer et al., 2007). No presente estudo, observamos que a administração subcutânea do inibidor da ornitina descarboxilase, o DFMO, teve um efeito antinociceptivo duradouro na alodínia mecânica induzida pelo CFA em ratos, estando de acordo com estudos que demonstraram que uma dieta pobre em poliaminas foi capaz de aliviar a hiperalgesia induzida por inflamação em ratos (Estebe et al., 2006; Rivat et al., 2008). Assim, tanto a restrição de ingestão de poliaminas quanto à inibição da síntese de poliaminas podem ser estratégias para melhorar o tratamento da dor inflamatória.

Diferentes estudos têm demonstrado um papel importante das poliaminas na artrite. Níveis aumentados de poliaminas são encontrados em fluído sinovial, urina e linfócitos de pacientes com artrite, sugerindo estar relacionado com a atividade e progressão da doença (Yukioka et al., 1992; Furumitsu et al., 1993; Neshet et al., 1997). Além disso, o efeito anti-artrítico do metotrexato parece estar associado com a sua capacidade em reduzir os níveis de poliaminas (Neshet et al., 1996; 1997). Foi também observado um nível aumentado de poliaminas na pata de ratos injetados com CFA (Chakradhar et al., 2007). Para confirmar a idéia da função das poliaminas periféricas como um agente pró-nociceptivo, nós mostramos que a administração exógena de poliaminas na pata de ratos desenvolveu alodínia mecânica, estando de acordo com trabalhos que demonstraram que a injeção intratecal de espermina produziu comportamentos nociceptivos em roedores (Kolhekar et al. 1994; Tan-No et al., 2000). Semelhante à medula espinhal, as poliaminas periféricas produzidas em tecido inflamado parecem também ter uma ação pró-nociceptiva.

Sugerindo que as doses de poliaminas em nosso estudo que causam nocicepção possam ser encontradas em tecidos inflamados, a concentração da

solução de espermina injetada (0,3-10 mM para gerar as doses de 0,03-1 mmol / pata) na pata de rato está no mesmo intervalo de concentração de espermina encontrada no tecido sinovial de pacientes com artrite (0,3 mM) ou no tecido da pata de ratos injetados CFA (cerca de 400 mM) (Yukioka et al., 1992; Chakradhar et al., 2007).

Além disso, verificamos que a potência, mas não a eficácia das poliaminas é responsável pela indução da alodínia mecânica, que parece ser dependente de sua carga, uma vez que a espermina, poliamina de maior carga que a putrescina foi mais potente em produzir nocicepção. Têm sido descritos algumas ações das poliaminas, dentre elas a interação com canais iônicos, como sendo carga-dependentes (Ahern et al., 2006). No entanto, o alvo exato em que as poliaminas interagem com os canais iônicos para produzir nocicepção ainda permanece desconhecido, porém, na medula espinhal o receptor NMDA é um importante alvo (Kolhekar et al., 1994; Tanno et al., 2000). Os receptores NMDA também são encontrados em terminações periféricas, os quais são estimulados pelo glutamato induzindo uma resposta nociceptiva em roedores (Carlton, 2001). Além disso, as poliaminas podem também estimular o receptor vanilóide TRPV1, que poderiam provocar a ativação do nociceptor (Ahern et al., 2006). No entanto, o exato mecanismo responsável pelo efeito nociceptivo induzido pelas poliaminas ainda precisa ser estudado.

Durante o processo inflamatório, é possível observar outros eventos além da nocicepção, como o edema. Similarmente ao procedimento nociceptivo, nós mostramos que a administração de poliaminas induziu a formação de edema, sendo que a espermina, das testadas, foi a poliamina mais potente. Além disso, nosso estudo mostrou que o tratamento com o DFMO foi capaz de reduzir o edema de pata induzido pelo CFA. De acordo com o nosso estudo, tem sido demonstrado que o tratamento com DFMO reduziu o edema produzido por injúria no intestino e no cérebro (Başkaya et al., 1996; Olson et al., 1985).

Também foi demonstrado no presente trabalho que a administração de CFA causou um aumento da atividade e expressão da ODC, quando comparado com o grupo controle. Além disso, o DFMO, nas doses em que teve um efeito anti-alodínico e anti-edematogênico foi capaz de reduzir a atividade da ODC, tanto nos animais tratados com CFA, quanto no grupo controle. A ODC é a enzima limitante da biossíntese das poliaminas, sendo altamente regulada e mudanças na sua atividade são provocadas por alterações na quantidade de proteína ODC, que renova-se

muito rapidamente (Pegg, 2006). De fato, nós detectamos que o CFA aumentou a quantidade da proteína ODC e sua atividade em 2 horas até 6 horas após a injeção. Assim, o aumento da atividade da ODC após a injeção de CFA, é de alguma maneira, relacionada com o aumento da quantidade de proteína.

A atividade da ODC varia em resposta a diversos estímulos, demonstrando que a atividade da PKC influencia o metabolismo das poliaminas, através de um regulamento crítico da ativação da ODC ao nível de sua transcrição, translocação e o “turnover” da proteína (Pegg, 2006; Shantz et al., 2007). Em exemplo, a atividade da ODC pode ser diminuída por depleção da PKC e aumentada pela super expressão de PKC (Zhao et al., 2009). Similarmente ao que foi encontrado na medula espinhal de roedores tratados com CFA, nos detectamos num primeiro momento, um aumento na ativação da PKC (detectada como um aumento na forma fosforilada da PKC α e sua relação entre a forma fosforilada da forma total da PKC α) 4 h após a administração de CFA. Este efeito não foi um achado inesperado, já que a injeção de adjuvante causa um aumento nos níveis de diversos mediadores pró-nociceptivos que estimulam a PKC, dentre esses mediadores encontram-se, as citocinas e o fator de crescimento de nervo (Woolf et al., 1997; Velázquez et al., 2007). Nós também detectamos uma diminuição dos níveis da forma total da PKC α no tempo de 6 horas após a administração de CFA. O que pode ser explicado pelo fato que a PKC α fosforilada torna-se sensível à degradação (Ohno et al., 1990).

Indicando que a PKC poderia estar envolvida na nocicepção inflamatória relacionada com as poliaminas, o inibidor da PKC GF109203X inibiu significativamente o aumento da atividade da ODC e da alodínia mecânica, sendo observado nos animais injetados com CFA sem, no entanto, alterar a atividade da ODC nos animais do grupo controle. Além disso, o inibidor da PKC foi mais eficaz que o inibidor da ODC (DFMO) em reduzir a alodínia mecânica causada pelo CFA, o que leva a supor que a PKC possa ter outros alvos pró-nociceptivos após a ação da ODC. De fato, a PKC é capaz de modular diversos canais iônicos e receptores, encontrados em neurônios sensoriais e que são responsáveis pela indução de dor (Birchall et al., 1994). Diferente da alodínia mecânica, o inibidor da PKC não foi capaz de alterar o edema formado nos tempos de 0,5 até 24 horas após a administração de CFA, resultado que esta de acordo com estudos que demonstraram que a PKC não esta relacionada com a primeira fase (1 até 9 dias) da indução do edema em ratos pelo CFA (Birchal et al., 1994).

Em conclusão, o presente estudo sugere que as poliaminas sintetizadas endogenamente estão envolvidas no desenvolvimento da nocicepção causada pelo adjuvante. Além disso, a produção das poliaminas nos sítios inflamatórios, parece estar relacionado com o aumento da atividade da ODC, estimulada pela ativação da PKC. Assim, o controle da síntese de poliaminas e sua ação poderiam ser um alvo importante para o controle da dor inflamatória.

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

7.1. A injeção do inibidor (DFMO) da enzima ornitina descarboxilase (ODC) causou redução da alodínia mecânica e do edema formado pela administração de CFA na pata de ratos.

7.2. A administração das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) na pata de ratos causou nocicepção (alodínia mecânica) e formação de edema em ratos.

7.3. Ocorreu um aumento da atividade após a administração de CFA na pata de ratos, e que esse aumento foi reduzido após a administração de DFMO. Além disso, houve também um aumento da expressão da ODC após injeção de CFA.

7.4. A administração de CFA causou um aumento da expressão da forma total, e ativação da forma fosforilada e da relação da forma total com a forma fosforilada da PKC. Além disso, observou-se que a administração de GF109203X (inibidor da PKC) causou uma redução da alodínia mecânica e da atividade da ODC, porém não teve efeito sobre a formação de edema.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERN GP, WANG, et al. **Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1.** J Biol Chem 281: 8991-8995, 2006.
- ASHBURN MA, STAATS PS. **Management of chronic pain.** Lancet 353:1865-1869, 1999.
- BACHRACH U. **The early history of polyamine research.** Plant Physiol Biochem 1-6, 2010.
- BAKKER MH, MCKERNAN RM, et al. **[³H] MK-801 binding to N-methyl-D-aspartate receptor solubilized from rat brain: effects of glycine site ligands, polyamines, ifenprodil, and desipramine.** J Neurochem 57: 39-45, 1991.
- BARDOCZ S, WHITE A, et al. **Uptake and bioavailability of dietary polyamines.** Biochem Soc Trans 24: 22-26, 1996.
- BENNETT GJ. **Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies?** Proc Natl Acad Sci USA 96: 7737-7738, 1999.
- BERLESE DB, SAUZEN PD, et al. **Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats.** Neurobiol Learn Mem 83:48-53, 2005.
- BESSION JM. **The neurobiology of pain.** Lancet 353: 1610-1615, 1999.
- BOWIE D, MAYER ML. **Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine – mediated ion channel block.** Neuron 15:453-62, 1995.
- CALIXTO JB, KASSUYA CA, et al. **Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions.** Pharmacol Ther 106:179-208, 2005.

- CARLTON SM. **Peripheral excitatory amino acids**. *Curr Opin Pharmacol* 1:52-56, 2001.
- CARTER C. **The neuropharmacology of polyamines**. Editora Academic Press, London, 1ª Edição, p. 318, 1994.
- CASERO RA, MARTON LJ. **Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases**. *Nat Rev Drug Discovery* 6:373-390, 2007.
- CATERINA MJ, JULIUS D. **The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway**. *Annu Rev Neurosci* 24:487-517, 2001.
- CATERINA MJ, LEFFLER A, et al. **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor**. *Science*, 288:306-313, 2000.
- CATERINA MJ, JULIUS D. **Sense and specificity: a molecular identify for noceceptors**. *Cur Opin Neurobiol* 9: 525-530, 1999.
- CHAKRADHAR LV, NAIK SR. **Polyamines in inflammation and their modulation by conventional anti-inflammatory drugs**. *Indian J Exp Biol* 45:649-53, 2007.
- CRAIG AD. **Interoception: the sense of the physiological condition of the body**. *Cur Opion Neurobiol* 13:500-505, 2003.
- DA SILVA FILHO AA, ANDRADE E SILVA ML, et al. **Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats**. *J Pharm Pharmacol* 56: 1179-1184, 2004.
- DAVIDSON NE, HAHM HA, et al. **Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment**. *Endoc-Relat Can* 6: 69-73, 1999.

- DAVIS JB, GRAY J, et al. **Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia.** *Nature*, 405:183-187, 2000.
- DRAY A, URBAN L, et al. **Pharmacology of chronic pain.** *Trends Pharmacol Sci* 15: 190-197, 1994.
- DRAY A, PERKINS MN. **Kinins and pain:** Farmer SG (ed). *The handbook of immunopharmacology. The kinin system.* Londres: Academic Press, pp. 157-172, 1997.
- ESTEVE JP, LEGAY F, et al. **An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain.** *Anesth Analg* 102:1781-1788, 2006.
- FAGE D, VOLTZ C, et al. **Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo.** *J Neurochem* 58: 2170-2175, 1992.
- FERREIRA J, DA SILVA GL, et al. **Contribution of vanilloid receptors to the spontaneous nociception induced by BK kinin receptor activation in mice.** *Br J Pharmacol* 141:787-794, 2004.
- FURUMITSU Y, YUKIOKA K, et al. **Levels of urinary polyamines in patients with rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 20:1661-5, 1993.
- GILAD GM, GILAD VH. **Polyamines can protect against ischemia-induced nerve cell death in gerbil forebrain.** *Exp Neurol* 111: 349-355, 1991.
- HALEY JE, WILCOX GL, et al. **Involvement of excitatory amino acids and peptides in the spinal mechanisms underlying hyperalgesia,** in Willis Jr WD. (Ed.), *Hyperalgesia and allodynia*, Vol. 24, Raven Press, New York, pp. 281-293, 1992.

- HAYAKAWA T, KUWAHARA S, et al. **Calcitonin gene-related peptide immunoreactive neurons innervating the soft palate, the root of tongue, and the pharynx in the superior glossopharyngeal ganglion of the rat.** J Chem Neuroanat, 2010,doi:10.1016/j.jchemneu.2009.12.003.
- HUNT SP, MANTYH PW. **The molecular dynamics of pain control.** Nat Rev Neurosci 2:83-91, 2001.
- JÄNNE J, ALHONEN L, et al. **Polyamines: from molecular biology to clinical applications.** Ann Med 23: 241-259, 1991.
- JOHNSON TD. **Modulation of channel function by polyamines.** Trends Pharmacol Sci 17: 22-27, 1996.
- JULIUS D, BASBAUM A. **Molecular mechanisms of nociception.** Nature 413:203-10, 2001.
- LARQUÉ E, SABATER-MOLINA M, et al. **Biological significance of dietary polyamines.** Nutrition 23:87-95, 2007.
- LAWRENCE, R et al. **Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.** Arthritis Rheum 41:778-779, 1998.
- LEVIN VA, et al. **Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination α -difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas.** Clin Cancer Res 9: 981-990, 2003.
- LOESER JD, TREEDE RD. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** Pain 137:437-477, 2008.
- KOLHEKAR R, MELLER ST, et al. **N-methyl-D-aspartate receptor-mediated changes in thermal nociception: allosteric modulation at glycine and polyamine recognition sites.** J Neurosci 63:925-936, 1994.

- KUSANO T, BERBERICH T, et al. **Polyamines: essential factors for growth and survival.** *Planta* 228:367-381,2008.
- MARCHAND F, PERRETTI M, et al. **Role of the immune system in chronic pain.** *Nat Rev Neurosci* 6:521-532, 2005.
- MEZEY E, TÓTH ZE, et al. **Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human.** *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3655-3660, 2000.
- MILLAN MJ. **The induction of pain: an integrative review.** *Prog Neurobiol* 57: 1-164, 1999.
- MILANO J, ROSSATO MF, et al. **Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice.** *Life Sci* 83:739-46, 2008.
- PAOLETTI P, NEYTON J. **NMDA receptor subunits: function and pharmacology.** *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47, 2007.
- PEGG AE. **Regulation of ornithine decarboxylase.** *J Biol Chem* 281:14529-14532, 2006.
- PILLAI RB, TOLIA V, et al. **Increased colonic ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children.** *Dig Dis Sci* 44:1565-70, 1999.
- RANSOM RW, STEC NL. 1988. **Cooperative modulation of [³H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines.** *J Neurochem* 51: 830-836, 1988.
- RIVAT C, RICHEBÉ P, et al. **Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity.** *Pain* 137:125-137, 2008.

- REN K, WILLIAMS JLK, et al. **The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats.** Eur J Pharmacol 219:235-243, 1992.
- ROMANO C, WILLIAMS K et al. **Polyamines modulate the binding of [³H] MK-801 to the solubilized N-methyl-D-aspartate receptor.** J Neurochem 57:811-818, 1991.
- RUBIN MA, STIEGEMEIER AJ, et al. **Intra-amygdala spermine administration improves inhibitory avoidance performance in rats.** Eur J Pharmacol 423:35-39, 2001.
- RUSSO CM, BROSE WG. **Chronic pain.** Annu Rev Med 49: 123-133, 1998.
- SEILER N. **Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. In Neuropharmacology of Polyamines.** Editora Academic Press, p.26-36, 1994.
- SEILER N. **Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach.** Prog Drug Res 37:107-159, 1991.
- SEILER N. **Polyamines metabolism.** Digestion 2:319-330, 1990.
- SHARMA JN, SAMUD AM, et al. **Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice.** Inflammo pharmacology 12:89-94,2004.
- TABOR CW, TABOR H. **Polyamines.** Annu Rev Biochem 53:749-790, 1984.
- TAN-NO K, TAIRA A, et al. **Intrathecally administered spermine produces the scratching, biting and licking behaviour in mice.** Pain 86; 55-61, 2000.

- TETI D, VISALLI M, et al. **Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 781: 107-149, 2002.
- TRACEY DJ, WALKER JS. **Pain in due to nerve damage: are inflammatory mediators involved?** Inflamm Res 44: 407-411, 1995.
- ZHAO YJ, ZHANG WH, et al. **Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition - induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts.** Mol Cell Biochem 332:135-144, 2009.
- ZHOU S, BONASERA SM, et al. **Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behavioral in rats.** Neuroreport 7:895-900, 1992.
- WALLACE HM, FRASER AV, et al. **A perspective of polyamine metabolism.** Biochem. J 376:1-14, 2003.
- WANG H, WOOLF CJ. **Pain TRPs.** Neuron 46:9-12, 2005.
- WATKINS LR, MAIER SF. **Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states.** Physiol Rev 82:981-1011, 2002.
- WHITESIDE GT, BOULET JM, et al. **The role of central and peripheral mu opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA ([8-(3,3-diphenyl-propyoxo-1-phenyl-1,3-triaza-spiro[4,5]dec-3-yl-acetic acid)).** J Pharmacol Exp Ther 314:1230-1240, 2005.
- WILLIAMS K. **Interactions of polyamines with ion channels.** Biochem J 325:289-297, 1997.
- WILLIAMS K, ROMANO C, et al. **Effects of polyamines on the binding of [³H] MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site.** Mol Pharmacol 36:575-581, 1989.

- WOOLF CJ, MANNION RJ. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** Lancet 353:1959-1964, 1999.
- WOLOS JA, LOGAN DE, et al. **Methylacetylenic Putrescine (MAP), an inhibitor of polyamine biosynthesis, prevents the development of collagen – induced arthritis.** Cell Immunol 125: 498-507, 1990.
- WORTHEN DR, GIBSON DA, et al. **Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the N-methyl-D-aspartate receptor complex.** Brain Res 890:343-346, 2001.
- YONEDA Y, OGITA K. et al. **Characterization of spermidine-dependent [³H](+)- 5 – methyl - 10, 11 – dihydro - 5H- dibenzo [a,d] cyclohepten - 5, 10 - imine (MK-801) binding in brain synaptic membranes treated with Triton X-100.** J Pharmacol Exp Ther. 256: 1161-1172, 1991.
- YUKIOKA K, WAKITANI S, et al. **Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis.** J Rheumtol 19:689-692,1992.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.