

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA**

**PATRICIA APARECIDA BATISTA**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES  
GLUTAMATÉRGICOS E DOS RECEPTORES DE  
POTENCIAL TRANSITÓRIO NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA DO (-)-LINALOL**

**FLORIANÓPOLIS / SC**

**2010**

**PATRICIA APARECIDA BATISTA**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES  
GLUTAMATÉRGICOS E DOS RECEPTORES DE  
POTENCIAL TRANSITÓRIO NA AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA DO (-)-LINALOL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares  
dos Santos**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda de  
Paula Werner**

FLORIANÓPOLIS / SC

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

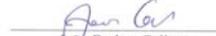
ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE  
PATRÍCIA APARECIDA BATISTA

Aos dezessete dias do mês de junho do ano dois mil e dez, nesta Cidade de Florianópolis, às 08:30 horas, no Auditório da Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores Adair Roberto Soares dos Santos (Orientador e Presidente), João Batista Calixto (FMC/UFSC), André Luiz Báfica (MIP/UFSC), Marília Zaluar P. Guimarães (ICB/UFRJ), Rafael Roesler (ICBS/UFRGS), designada pela Portaria nº 014/PGFMC/2010, datada do dia 14 de junho de 2010, do Senhor Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas desta Universidade, a fim de argüirem a Tese de Doutorado de PATRÍCIA APARECIDA BATISTA sob o título "Participação dos Receptores Glutamatérgicos e dos Receptores de Potencial Transitório na Ação Antinociceptiva do (-)-Linalol". Aberta a sessão pelo Presidente, a doutoranda expôs, na forma regimental, o tema de sua Tese dentro do tempo regulamentar. A seguir a doutoranda foi argüida pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, deu as explicações que se faziam necessárias. Logo após a Banca Examinadora reuniu-se reservadamente para proceder à Avaliação Final, conforme critérios estabelecidos pelo Regimento do Curso, sendo a candidata considerada **APROVADA**, para receber o Título de **DOUTOR EM FARMACOLOGIA**, Área de Concentração: Farmacologia. Foi sugerido pela Banca Examinadora quais os pontos da tese a serem reformulados, o que deverá ser feito e entregue em sua forma definitiva no prazo de sessenta dias, a contar da presente data, de acordo com os parágrafos 1º e 2º do Artigo 62 do Regimento do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata de número 188 referente às defesas públicas realizadas neste Programa, que lida e achada conforme, vai assinada, pelos membros da Banca Examinadora e pela Candidata.

Florianópolis, 17 de junho de 2010.

Banca Examinadora:

  
Adair Roberto Soares dos Santos

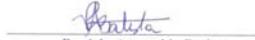
  
João Batista Calixto

  
André Luiz Báfica

  
Marília Zaluar P. Guimarães

  
Rafael Roesler

Candidata:

  
Patrícia Aparecida Batista

*“Dream, no small dreams for they have no power to move the hearts of men.” - Johann Wolfgang von Goethe*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, Paulo e Edmeia, e irmãos, Paulo e Ana Paula, pelo amor, incentivo, torcida pelo sucesso e constante apoio nesta jornada.

Ao Orientador Prof Dr. Adair, pela amizade, paciência, exemplo de mestre, ensinamentos e, especial atenção para formação de uma futura orientadora, minha admiração, sinceros e eternos agradecimentos.

A Dra. Gina Story, pela especial recepção em seu laboratório na Washington University in Saint Louis, pela confiança, liberdade, colaboração direta, incentivo e orientação. A essa pessoa tão querida, obrigada pelo apoio e amizade.

Ao Prof Dr. João B. Calixto por abrir as portas de seu laboratório e colaborar diretamente com parte da realização deste trabalho.

A Dra. Maria Fernanda de Paula Werner pela amizade e valiosa ajuda na discussão, desde a elaboração até a efetivação e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Padua e ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela minha valiosa formação científica.

A Dra. Edineia Lemos de Andrade pela valiosa colaboração e discussão em parte dos experimentos.

Aos alunos do laboratório do Prof. Dr. Adair, Érica, Telga, Mara e Murilo pela realização de parte dos experimentos.

Aos alunos do laboratório da Dra. Gina Story, Jenny, Malcolm, Thomas e Eli, obrigada pelos ensinamentos e auxílio na realização de algumas técnicas

A minha amiga que conquistei, Dra. Ana Luiza Mandelli Gleisner pela sincera amizade e imensa ajuda em todos os momentos em que precisei, enquanto estive em St Louis.

A amiga Yingqi Weng pela amizade, pelos ótimos momentos vividos, discussão e colaboração nos experimentos realizados para construção deste trabalho.

As minhas eternas amigas Louise D. Chiaradia e Karine Dal Paz pela sincera amizade e por estarem presentes em todos os momentos especiais na minha vida.

A CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

## Lista de abreviações

AITC	Alil isotiocianato
AMPA propionato	$\alpha$ -Amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-
ANKTM1	Ankyrin like-protein
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Ativador de proteína 1
AP-5	Ácido (2R)-amino-5 fofonovalérico
AP-18	4-4-Clorofenil-3-metil-3buteno2-1 oxima
ASICs	Canais iônicos sensíveis à ácido
ATF2	Fator de ativação da transcrição 2
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina soro bovina
$[Ca^{+2}]_i$	Concentração de íons cálcio intracelular
CEUA	Comitê de Ética para o uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGRP calcitonina	Peptídeo relacionado ao gene da
CHO	Ovário de hamister chinês
COX2	Ciclooxigenase do tipo 2
DH	Corno dorsal
DMPX	3,7-Dimetil-1-(2-propinil)xantina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ECL	Eletroquimioluminescência
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FBS	Soro fetal bovino
GABA	Ácido gama - aminobutírico
GFR $\alpha$ -1	Receptor de GDNF alfa do tipo 1
GFR $\alpha$ -2	Receptor de GDNF alfa do tipo 2
HEK293	Rim embriônico humano
HNE	4-Hidroxinonenal

IASP	Associação Internacional para o Estudo da
Dor	
ID <sub>50</sub>	Dose inibitória 50%
iGluR	Receptores Glutamatérgicos do tipo
ionotrópicos	
IL-1 $\beta$	Interleucina 1beta
i.p.	Intraperitoneal
I.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
JNK	Quinase c-Jun N terminal
KO	Knockout
LPNC	Ligação parcial do nervo ciático
LPS	Lipopolissacarídeo
LL	(-)-Linalol
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCCG	$\alpha$ -Methyl-ciclopropil glicine
mGluR	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK801	(+)-5-Metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino maleato
MSOP	(R,S)-Alfa-metilserina-O-fosfato
NBQX	2,3-DiIdroI-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalina-2,3-diona
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NGF	Fator de crescimento do nervo
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositol 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PMA	Acetato miristato de forbol
PVDF	Fluoreto de polivilideno
s.c.	Subcutânea
SCH-23390	(+)-8-Cloro-2,3,4,5-tetraidro-3-metil-5-fenil-1H-3-benzazepina-7-ol
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
SP600125	Antra(1,9-cd)pirazol-6(2H)-1,1,9-

	pirazoloantrona
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
<i>trans</i> -ACPD	Ácido <i>trans</i> -1,3 dicarboxílico 1-aminociclopentano
TrkA	Receptor tirosina quinase A
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório do tipo A1
TRPA1 KO	Deleção gênica para o canal TRPA1
TRPC	Receptor de potencial transitório clássico
TRPM4	Receptor de potencial transitório do tipo melastatina 4
TRPM5	Receptor de potencial transitório do tipo melastatina 5
TRPM8	Receptor de potencial transitório do tipo melastatina 8
TRPML	Receptor de potencial transitório do tipo mucolipina
TRPP	Receptor de potencial transitório do tipo policistina
TRPV1	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1
TRAPV1 KO	Deleção gênica para o canal TRPV1
TRPV2	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 2
TRPV3	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 3
TRPV4	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 4
TRPV5	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 5
TRPV6	Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 6
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v.o.	Via oral
WT	Wild type ou selvagem
WUSTL	Washington University in St Louis

## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Responsividade de neurônios do gânglio da raiz dorsal estimulados com (-)-linalol (500 $\mu$ M), capsaicina (1 $\mu$ M), alilisotiocianato (AITC, 100 $\mu$ M) ou mentol (100 $\mu$ M).....	62
<b>Figura 1:</b> Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC.....	04
<b>Figura 2.</b> A superfamília TRPs. Representação de um único membro de cada família do grupo 1 e 2 .....	12
<b>Figura 3.</b> Estrutura de canais da família TRP.....	12
<b>Figura 4.</b> Canais TRPs ativados por diferentes faixas de temperatura e substâncias derivadas de produtos naturais.....	13
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do (-)-linalol.....	17
<b>Figura 6.</b> Plantas aromáticas que possuem como componente principal o (-)-linalol.....	17
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	36
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da avaliação do efeito do (-)-linalol (500 $\mu$ M) em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	37

<b>Figura 9.</b> Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos.....	38
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de células CHO transfectadas para expressarem os receptores TRPA1 ou TRPV1.....	39
<b>Figura 11.</b> Comparação entre as respostas nociceptivas obtidas das duas linhagens de camundongos utilizadas nestes estudo.....	40
<b>Figura 12.</b> Efeito do (-)-linalol administrado por diferentes vias na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.....	42
<b>Figura 13.</b> Efeito da administração de (-)-linalol na resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato, agonistas de receptores glutamatérgicos e substância P.....	43
<b>Figura 14.</b> Efeito da administração de (-)-linalol na resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ .....	44
<b>Figura 15.</b> Efeito da administração de (-)-linalol no desempenho motor e efeito sedativo no teste do rota-rod.....	45
<b>Figura 16.</b> Efeito do (-)-linalol administrado por diferentes vias na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	46
<b>Figura 17.</b> Efeito do (-)-linalol administrado por diferentes vias a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	47

<b>Figura 18.</b> Dercurso temporal da hipernocicepção ao calor induzida pela injeção intraplantar de diferentes concentrações de cinamaldeído.....	48
<b>Figura 19.</b> Efeito da administração de (-)-linalol na hipernocicepção ao estímulo quente induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	49
<b>Figura 20.</b> Efeito da administração aguda de (-)-linalol e do inibidor da JNK (SP 600125) na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	50
<b>Figura 21.</b> Efeito do (-)-linalol na fosforilação da p38MAPK na medula espinhal e na pata induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído.....	51
<b>Figura 22.</b> Efeito do (-)-linalol na fosforilação da ERK na medula espinhal e na pata induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído.....	52
<b>Figura 23.</b> Efeito do (-)-linalol ou veículo na fosforilação da JNK na medula espinhal e na pata induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído.....	53
<b>Figura 24.</b> Efeito nociceptivo do cinamaldeído injetado intratecalmente em animais selvagens e efeito do antagonista AP-18 e TRPA1 KO.....	54
<b>Figura 25.</b> Efeito do (-)-linalol administrado oralmente contra a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído ou capsaicina.....	55
<b>Figura 26.</b> Efeito do (-)-linalol na fosforilação da JNK na medula espinhal induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído.....	55

<b>Figura 27.</b> Efeito da administração oral de (-)-linalol na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA.....	56
<b>Figura 28.</b> Efeito da administração de (-)-linalol na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em animais com deleção gênica para o TRPA1.....	57
<b>Figura 29.</b> Efeito da administração intraplantar de AP-5, MK 801 ou da co-administração de (-)-linalol com MK801 na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.....	59
<b>Figura 30.</b> Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol ou veículo no aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cultura de células CHO transfectadas com TRPA1.....	60
<b>Figura 31.</b> Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol ou veículo no aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cultura de células CHO transfectadas com TRPV1.....	61
<b>Figura 32.</b> Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol, veículo ou MK801 no aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos ativadas com alilisotiocianato, AITC.....	63
<b>Figura 33.</b> Representação gráfica do efeito do glutamato no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal.....	64
<b>Figura 34.</b> Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol ou veículo no aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal ativadas com glutamato.....	65

<b>Figura 35.</b> Efeitos da administração aguda e crônica de (-)-linalol na hipersensibilidade mecânica em camundongos 24 horas após a injeção de CFA.....	67
<b>Figura 36.</b> Decurso temporal do efeito da administração aguda de (-)-linalol na hipersensibilidade ao estímulo não – nocivo frio (acetona) em camundongos 24 horas após a injeção de CFA.....	68
<b>Figura 37.</b> Decurso temporal do efeito da administração aguda de (-)-linalol no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de CFA.....	69
<b>Figura 38.</b> Efeitos da administração de (-)-linalol na hipersensibilidade mecânica em camundongos que não expressam TRPA1 24 horas após a injeção de CFA.....	70
<b>Figura 39.</b> Efeitos da administração aguda e crônica de (-)-linalol na hipernocicepção mecânica em camundongos sete dias após a ligação parcial do nervo ciático.....	72
<b>Figura 40.</b> Efeito da administração intraperitoneal de (-)-linalol no tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada e na latência de retirada da pata induzidos por estímulo frio ( $5,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em camundongos 7 dias após a ligação parcial do nervo ciático.....	73
<b>Figura 41.</b> Possíveis sítios de ação do (-)-linalol (LL) com consequente redução da nocicepção.....	92

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o de estender e confirmar a ação antinociceptiva do (-)-linalol, bem como do envolvimento do sistema glutamatérgico e dos receptores de potencial transitório (TRP) no seu mecanismo de ação antinociceptivo em camundongos. O (-)-linalol administrado via sistêmica (intrapertoneal ou oral), central (intratecal) ou periférica (intraplantar) inibiu, de maneira dependente da dose, a nocicepção induzida pelo glutamato. Além disso, o (-)-linalol foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela injeção intratecal de agonistas iGluRs (NMDA, AMPA e cainato), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e SP. Entretanto, não preveniu a nocicepção induzida pelo *trans*-ACPD, agonista mGluR. Por outro lado, o (-)-linalol também inibiu a nocicepção induzida pelo cinamaldeído (CA, agonista TRPA1) e somente uma dose alta de (-)-linalol (200 mg/kg) foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela capsaicina (agonista TRPV1). Além disso, o (-)-linalol inibiu a hipernocicepção mecânica, mas não a hipernocicepção térmica (quente), induzida pelo CA (i.pl.). A injeção i.pl. de glutamato induziu nocicepção em animais com deleção gênica TRPA1<sup>-/-</sup> de maneira equivalente àquela observada em camundongos selvagens, sendo que a nocicepção induzida pelo glutamato em animais TRPA1<sup>-/-</sup> foi também reduzida pelo (-)-linalol. O MK801 (antagonista de receptores NMDA) foi capaz de inibir a nocicepção induzida pelo CA e, interessante, a co-administração de doses sub-efetivas de (-)-linalol e de MK801 promoveram redução significativa da nocicepção induzida pelo CA. Usando a técnica de imagens de Ca<sup>+2</sup>, observou-se que o (-)-linalol inibiu o aumento da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> induzido pelo agonista TRPA1 (alil isotiocianato) em células CHO transfectadas com TRPA1. Porém, apenas a maior dose inibiu o aumento da [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> induzido pela capsaicina em cultura de células CHO transfectadas com TRPV1. Em cultura de neurônios do GRD, a adição de (-)-linalol (500  $\mu$ M) ao sistema causou um aumento na [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> tanto em neurônios sensíveis quanto insensíveis aos agonistas TRPs (mentol, alil isotiocianato e capsaicina). Entretanto, doses menores de (-)-linalol (100 e 250

$\mu\text{M}$ ) foram capazes de reduzir o aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  em neurônios do GRD induzido pelo AITC, sendo que esta resposta não foi bloqueada pela infusão de MK801. O (-)-linalol (500  $\mu\text{M}$ ) também foi capaz de reduzir o aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  induzido pelo glutamato em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal. É importante mencionar que o (-)-linalol foi também efetivo em modelos de dor crônica. Assim, o (-)-linalol foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica (frio), bem como o edema de pata, induzida pelo CFA. Contudo, o (-)-linalol não foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA em animais TRPA1<sup>-/-</sup>, sugerindo que o efeito do (-)-linalol na hipersensibilidade mecânica parece envolver os canais TRPA1. Na neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo ciático, o (-)-linalol também foi eficiente em atenuar a hipersensibilidade mecânica. Portanto, o presente trabalho estende os dados descritos na literatura e demonstra que o (-)-linalol é eficaz em vários modelos de dor aguda e crônica, sendo, então, uma molécula interessante para o desenvolvimento de fármacos terapêuticamente úteis no controle de estados de dor, principalmente estados de dor crônica.

Palavras – chave: (-)-linalol, glutamato, receptor NMDA, TRPA1, nocicepção

## Abstract

The objective of the present work was to extend and confirm the antinociceptive action of (-)-linalool, as well the involvement of glutamatergic system and transient receptor potential (TRP) channels in the mechanism (s) underlying the antinociceptive action of (-)-linalool. (-)-Linalool administered by systemic, central or peripheral routes inhibited, dose-dependent, the nociception induced by glutamate and the nociception induced by intrathecal injection of iGluRs agonists (NMDA, AMPA and kainate), pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) and SP. This compound also inhibited the nociception induced by cinnamaldehyde (CA, TRPA1 agonist) and only the highest dose of (-)-linalool (200 mg/kg) was able to inhibit the nociception induced by capsaicin (TRPV1 agonist). Moreover, (-)-linalool inhibited the mechanical hypersensitivity, but it did not reduce the thermal hypersensitivity, induced by CA (i.pl.). MK801 (NMDA antagonist) was able to inhibit the nociception induced by CA and, interestingly, sub-effective doses of (-)-linalool co-administered with MK801 promoted significant reduction of CA-induced nociception. We observed that (-)-linalool inhibited the  $[Ca^{+2}]_i$  increase induced by TRPA1 agonist (AITC, allyl isothiocyanate) in CHO cells. In DRG neurons, (-)-linalool inhibited the  $[Ca^{+2}]_i$  increase by AITC, not being blocked by MK801. Also, (-)-linalool was able to reduce  $[Ca^{+2}]_i$  increased induced by glutamate in cultured dorsal horn neurons. It is important to mention that (-)-linalool was effective in pain chronic models. Therefore, (-)-linalool was able to reduce mechanical and thermal (cold) hypersensitivity induced by both CFA and nerve injury, but did not reduce the mechanical hypersensitivity induced by CFA in TRPA1<sup>-/-</sup>. So, this study adds information about the antinociceptive action of (-)-linalool and indicates that (-)-linalool might be potentially interesting in the development of new clinically relevant drugs for the management of persistent pain.

Key-words: (-)-linalool, glutamate, TRPA1, NMDA receptor, nociception



## **1. Introdução**

### **1.1 Dor e processamento da informação nociceptiva**

Uma das funções vitais do sistema nervoso é processar informação sobre a ocorrência ou ameaça de lesão. Portanto, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a detecção e diagnóstico de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (Millan, 1999; Woolf, 2000; Almeida et al., 2004). Por outro lado, a dor é um fenômeno de suprema relevância, uma vez que diminui drasticamente a qualidade de vida dos portadores deste sintoma que, em alguns casos, pode tornar-se uma doença. A dor causa reações emocionais negativas e, quando persistente, torna-se debilitante e causadora de sofrimento (Griffis et al., 2006). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como sendo uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão (Merskey e Bogduk, 1994). Do ponto de vista fisiológico, a dor aguda é necessária à sobrevivência e manutenção da integridade do organismo, pois tem como propósito detectar estímulos nocivos que podem acarretar lesões teciduais, ou ainda, desencadear comportamentos de proteção de um membro já lesado, a fim de promover a resolução da mesma.

Já está bem estabelecido que a dor é uma experiência complexa e envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (Chapman e Gavin, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Almeida e colaboradores (2004) descreveram que, enquanto o sistema sensorial permite a localização espaço-temporal, a qualificação física e a intensidade do estímulo nocivo, o componente cognitivo afetivo atribui emoções à experiência, sendo responsável pelas respostas comportamentais à dor. Sendo assim, a sensação dolorosa é influenciada tanto por fatores fisiológicos quanto psicológicos, e por essa razão, em animais é avaliada de

forma indireta, pois, além da experiência emocional, a dor está associada a um componente sensorial, denominado nocicepção (para revisão ver Millan 1999).

Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (Tjølsen e Hole, 1997; Almeida et al., 2004). A função de alerta da dor reflete a ativação fásica de sensores denominados nociceptores, os quais são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excedem uma determinada faixa considerada fisiológica (Burgess e Perl, 1967; Millan, 1999).

As fibras sensoriais altamente especializadas, sozinhas ou em conjunto com outras fibras especializadas, fornecem informação para o sistema nervoso central não somente sobre o ambiente, mas também sobre o estado do organismo. A detecção do estímulo nocivo depende da ativação de receptores específicos e vias neuroanatômicas que fazem a comunicação entre o sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central (Tjølsen e Hole, 1997; Russo e Brose, 1998). Devido ao fato destes receptores responderem preferencialmente a estímulos nocivos, são chamados de nociceptores. Dentre as muitas variedades de receptores sensoriais, os nociceptores são distintos na medida em que tipicamente respondem a múltiplas formas de produção de lesão (estímulos térmicos, mecânicos e químicos), e fornecem informação para o sistema nervoso central com respeito à localização e intensidade dos estímulos nocivos (Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

Os nociceptores estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos (Julius e Basbaum, 2001). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (Julius e Basbaum, 2001).

Em termos de duração, a sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Quando transitória, a ativação de nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Em contrapartida, na dor aguda geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado. Por sua vez, a dor crônica, na maioria das vezes é gerada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não os causadores da dor, podendo permanecer mesmo após a recuperação do indivíduo persistindo por meses ou anos (Loeser and Melzack, 1999; Woolf e Mannion, 1999; Zimmermann, 2001; Mendell e Sahenk, 2003).

Quanto a sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória. A dor nociceptiva deve-se à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos. A dor neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no Sistema Nervoso Central (SNC). Quando há disfunção ou dano do nervo ou grupos de nervos, resultando em quadro algico denomina-se dor neuropática. No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, diz-se dor psicogênica (Millan, 1999). Por fim, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação (Dray, 1997).

Os estímulos de natureza mecânica, térmica ou química são detectados por e transmitidos ao sistema nervoso central através de fibras aferentes primárias periféricas, que podem ser classificadas de acordo com a modalidade sensorial, os seus diâmetros e ainda com base na velocidade com que conduzem potenciais de ação (Figura 1). Dessa maneira, fibras A $\alpha$  e A $\beta$  representam os proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo. Essas fibras são altamente mielinizadas, de maior diâmetro (> 10  $\mu$ m), apresentam velocidade de condução rápida (30 a 100 m/s) e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Por outro lado, algumas fibras com diâmetros menores possuem terminações nervosas periféricas livres, apresentam alto limiar de

ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos, sendo, portanto, denominadas de nociceptores. Entre elas, as fibras A $\delta$  são responsáveis pela detecção da dor rápida e aguda, sendo pouco mielinizadas, de médio diâmetro (2 a 6  $\mu$ m) e velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s), enquanto que as fibras C são condutoras da dor lenta e difusa, sendo amielinizadas, de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2  $\mu$ m) e velocidade de condução lenta (0,5 a 2 m/s) (para revisão ver Millan, 1999; Djouhri e Lawson, 2004).

Tipo de fibra	 A $\alpha$ e A $\beta$	 A $\delta$ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 $\mu$ m	2 - 6 $\mu$ m	0.4 - 1.2 $\mu$ m
Velocidade de condução	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

**Figura 1:** Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001.

A lesão resulta na liberação local de numerosas substâncias químicas que medeiam ou facilitam o processo inflamatório, incluindo bradicinina, prostaglandina, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tramboxanos, fator de ativação plaquetária, adenosina e ATP, prótons e radicais livres. As citocinas, tais como as interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF), e neurotrofinas, especialmente o fator de crescimento do nervo (NGF) são também geradas durante a inflamação. O NGF não é somente necessário

para a sobrevivência dos nociceptores durante o desenvolvimento, mas pode também ter um papel importante durante o processo inflamatório em animais adultos (para revisão ver McMahon et al., 2005). Alguns destes agentes podem diretamente ativar os nociceptores enquanto, que, outros agem indiretamente via células inflamatórias, as quais então liberam os agentes algogênicos (Julius e Basbaum, 2001; Griffs et al., 2006).

Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a uma propagação do sinal nociceptivo graças a um aumento na permeabilidade da membrana neuronal a cátions e, conseqüentemente, geração do potencial de ação (Carlton e Coggeshall, 1999; Pasero et al., 1999; Raja et al., 1999). Entretanto, para alguns destes receptores é questionável se a ligação de um ligante específico resulta em excitação de fibras nociceptivas. Ainda, estes receptores podem modular a sensibilidade de nociceptores periféricos a estímulos exógenos. Uma variedade de receptores, incluindo receptores de potencial transitório (TRPs) e receptores glutamatérgicos, foi identificada em células do gânglio da raiz dorsal e em terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas.

As regiões da cabeça e do corpo são inervadas por neurônios sensoriais cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios trigeminiais e nos gânglios da raiz dorsal (GRD), respectivamente. Ambas as estruturas são agrupamentos de corpos celulares de neurônios, normalmente encapsulados por células satélites de origem glial, responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal, respectivamente (Beeson, 1999). Situados na coluna vertebral e dispostos lateralmente ao longo da medula espinhal, os GRDs contêm ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos que apresentam propriedades diferentes da barreira hematoencefálica do sistema nervoso central (Olsson, 1990).

Os estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas, gerando correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam

os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais de sódio sensíveis a voltagem. Sabe-se que uma vez ativadas, as fibras aferentes primárias liberam vários neurotransmissores (p. ex. glutamato), que por sua vez irão ativar neurônios secundários específicos, localizados em lâminas de Rexed na medula espinhal. A organização arquitetônica da medula espinhal permite distinguir anatomicamente onde cada tipo de fibra aferente primária termina, sendo que, as lâminas de I a VI, fazem parte do corno dorsal, as lâminas VII, VIII e IX constituem o corno ventral e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal medular. Dessa maneira, fibras A $\beta$ , que conduzem informações não-nociceptivas, terminam principalmente nas lâminas III e IV, enquanto as fibras nociceptivas A $\delta$  e C projetam-se nas lâminas I e II, tornando-as importantes sítios para a regulação da informação nociceptiva (para revisão ver Besson e Chaouch, 1987; Willis e Coggeshall, 1991; Millan, 1999). Adicionalmente, as fibras C ainda podem ser divididas em dois subtipos considerando suas características neuroquímicas e funcionais. As fibras C peptidérgicas contêm neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P, projetam-se na lâmina I e na camada mais superficial da lâmina II e são reguladas pela neurotrofina, fator de crescimento do nervo (NGF), que atua pelo receptor trkA. Por outro lado, as fibras C não-peptídicas são identificadas pela expressão de receptores purinérgicos P2X3 para o trifosfato de adenosina (ATP), por conter a fosfatase ácida resistente ao fluoreto (FRAP) e por apresentar em sua membrana resíduo do carboidrato  $\alpha$ -D-galactose, que se liga à isolectina-B4 (IB4), derivada da planta *Griffonia simplicifolia*. Além disso, essas fibras terminam predominantemente na camada mais profunda da lâmina II, respondem ao fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e apresentam receptores c-ret, GFR $\alpha$ -1 e GFR $\alpha$ -2 para essa neurotrofina (Nagy e Hunt, 1982; Hunt e Rossi, 1985; Silverman e Kruger, 1990; Willis e Coggeshall, 1991; Michael et al., 1997; Bennett et al., 1998; Stucky e Lewin, 1999).

Os neurônios nociceptivos de segunda ordem também apresentam grande diversidade funcional. Quando presentes nas lâminas I e II são denominados nociceptivos específicos, pois

possuem alto limiar de excitabilidade e fazem sinapses com fibras C e A $\delta$ . Já os neurônios que fazem sinapses nas lâminas IV e V são excitados por estímulos de intensidade variada e são denominados neurônios de faixa dinâmica ampla (Millan, 1999).

As fibras aferentes primárias podem ainda fazer sinapses com neurônios não nociceptivos localizados nas lâminas II, III e IV. A transmissão da informação nociceptiva pode ser regulada negativamente por interneurônios inibitórios, que fazem sinapses na lâmina II, também conhecida como substância gelatinosa, onde liberam neurotransmissores e neuromoduladores tais como o GABA, encefalinas e glicina, entre outros (para revisão ver Millan, 1999). A partir da transmissão da informação nociceptiva ao neurônio de segunda ordem espinhal, esta ascenderá para múltiplas áreas supraespinhais através de tratos neuronais específicos. Através do emprego de técnicas de neuroimagem por tomografia de emissão de pósitrons ou ressonância magnética, revelou-se a ativação de múltiplas áreas cerebrais envolvidas no processamento da dor durante a estimulação nociva aguda (Derbyshire et al., 1997). Entre as vias clássicas destaca-se o trato espinoparabraquial, que termina no núcleo parabraquial e se dirige para o hipotálamo e amígdala, estruturas relacionadas com componentes afetivos da dor. Outra importante via corresponde ao trato espinotalâmico, que termina no núcleo ventrobasal do tálamo e projeta-se para o córtex, sendo responsável pela discriminação (percepção da sensação dolorosa) e por componentes afetivos da dor (desconforto e reações aversivas). Assim, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção do estímulo nociceptivo. Ainda nesse nível, a informação nociceptiva pode ser modulada pela ativação de vias descendentes centrais originadas na amígdala e no hipotálamo e que terminam, principalmente, na substância cinzenta periaquedutal (Russo e Brose, 1998; Treede et al., 1999; para revisões ver Milan, 1999; Hunt e Mantyh, 2001).

## 1.2 Sistema glutamatérgico

A informação nociceptiva que se projeta pelas vias ascendentes, também chamadas de vias de 2ª ordem, é estimulada pelos neurônios aferentes primários principalmente pela liberação de glutamato e substância P (SP) (Hill, 2001). Assim, é notório que o glutamato exerce um papel fundamental na sinalização do processo nociceptivo a nível espinhal, sendo liberado a nível central após lesão tecidual (Jackson et al., 1995). O glutamato desempenha importante papel no controle dos processos excitatórios e de sensibilização dos nociceptores e, conseqüentemente, no estabelecimento da hipersensibilidade mecânica ou térmica (Jackson et al., 1995). Todos os receptores de glutamato, cada um com sua peculiaridade, participam da indução, modulação e manutenção da dor (Carlton e Coggeshal, 1999; Beirith et al., 2002). Os receptores glutamatérgicos (GluR) são divididos em duas grandes classes: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos do glutamato (iGluR) são canais iônicos permeáveis a cátions e são ainda subdivididos em três subclasses: ácido caínico (cainato), ácido -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Ozawa et al., 1998).

Os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR) são acoplados às proteínas de ligação ao GTP, conhecidas como proteínas G, e operam tanto pela liberação de segundos mensageiros intracelulares ou por influenciar canais iônicos através da interação com as subunidades da proteína G através da membrana (Meldrum, 2000). Atualmente, 8 subtipos de receptores metabotrópicos já foram clonados e denominados GluRms 1-8, classificados em diferentes grupos: grupo I (GluRms 1 e 5) que levam a estimulação da fosfolipase C, II (GluRms 2 e 3) e III (GluRms 4, 5, 6, 7 e 8) que inibem a atividade da adenilato ciclase (Ozawa et al., 1998, Goudet et al., 2008). A ativação dos nociceptores periféricos, causada por lesão tecidual, inflamação ou lesão de nervo, provoca co-liberação de glutamato e SP, dos aferentes primários, ativando assim seus receptores específicos localizados nas fibras secundárias (Chizh, 2002). Além disso, os receptores NMDA também estão presentes pré-sinápticamente nos terminais nervosos dos neurônios aferentes

primários que contêm SP (Shigemoto et al., 1992; Liu et al., 1994). Existem ainda dados na literatura demonstrando que a ativação dos receptores NMDA pré-sinápticos aumentam os efeitos pós-sinápticos causados pelo glutamato na produção da dor, pois a liberação espinhal de SP é, pelo menos em parte, dependente da ativação dos receptores NMDA pelo glutamato (Liu et al., 1994; Afrah et al., 2000). O glutamato e a SP liberados centralmente são capazes de ativar as células gliais promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ambos mediadores nociceptivos (para revisão ver Wieseler-Frank et al., 2004). Sabe-se ainda que a administração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em animais e humanos é capaz de produzir dor e hiperalgesia pela ativação e sensibilização de neurônios sensoriais nociceptivos (para revisão ver McMahon et al., 2005). Neste sentido, Kleinschnitz e colaboradores (2004) demonstraram recentemente que os receptores glutamatérgicos NMDA modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , em dois modelos de lesão de nervo periférico em camundongos. Além disso, está bem estabelecido que tais citocinas pró-inflamatórias, bem como a ativação dos receptores glutamatérgicos, causam potente estimulação da produção de óxido nítrico, outro importante modulador da transmissão nociceptiva (Evans e Ralston, 1996; Hill, 2001).

No entanto, tem sido demonstrado que diversos sistemas de transmissores têm a capacidade de interferir na transmissão nociceptiva no SNC por causa de sua ação modulatória sob o sistema glutamatérgico (Larsson, 2009).

Os terminais centrais derivados das fibras aferentes primárias fazem a primeira sinapse com os neurônios do corno dorsal. Nestas sinapses, o glutamato é usado com um neurotransmissor excitatório rápido para converter os sinais sensoriais da periferia (Yoshimura e Jessel, 1990). Um grande número de canais é expresso nos terminais centrais das fibras aferentes primárias e possuem um importante papel na modulação sináptica da liberação de neurotransmissores para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Larsson, 2009).

Recentemente, foi descrito que a ativação do sistema glutamatérgico pode modular positivamente a função do receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1) que é um canal catiônico não seletivo permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Por exemplo, receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico do grupo 1 aumentam a sensibilidade térmica por facilitar a abertura do canal vanilóide (Hu et al., 2002). Além disso, receptores NMDA periféricos modulam a atividade eletromiográfica muscular da mandíbula induzida pela injeção de capsaicina na articulação temporomandibular de ratos (Lam et al., 2005). Um estudo feito por Jin e colaboradores (2006) mostrou que a aplicação de creme de capsaicina no dorso do pé, também provoca um marcado aumento nos níveis de glutamato, sendo que esta liberação foi significativamente diminuída pelo tratamento com capsaicina, por 3 dias consecutivos. Em 2009, este mesmo autor mostrou que a injeção subcutânea (s.c.) de capsaicina aumenta a liberação de glutamato, sendo esta inibida pela administração de capsazepina (um antagonista competitivo de receptores TRPV1) e antagonistas de receptores ionotrópicos e metabotrópicos do grupo 1 glutamatérgicos. Estes achados indicam que os receptores glutamatérgicos periféricos são responsáveis pelas respostas nociceptivas via ativação do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1).

Com respeito aos receptores de potencial transitório do tipo A1 (TRPA1), foi demonstrado que este receptor também é um canal catiônico não seletivo permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo encontrados co-expressos com os receptores TRPV1 em neurônios sensoriais (Story et al., 2003). Em 2007, Kosugi e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que agonistas seletivos para o receptor TRPA1, alil isotiocianato (AITC) e cinamaldeído, marcadamente aumentam a transmissão sináptica excitatória através do aumento da liberação de glutamato pela entrada direta de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através de receptores TRPA1 em terminais de fibras nervosas. Mais recentemente, Wrigley e colaboradores (2009) demonstraram que AITC e cinamaldeído modulam a transmissão glutamatérgica em subpopulações de neurônios das lâminas I e II<sub>0</sub> do corno dorsal da medula espinhal.

### 1.3 Receptores de Potencial Transitório

A história dos Receptores de Potencial Transitório (TRPs) começou em 1969, quando Cosen e Manning descobriram uma *Drosophila* mutante que mostrou uma resposta transitória à luz brilhante (Cosens e Manning, 1969). Análises das células fotorreceptoras de voadores mutantes revelaram que a exposição mantida à luz induziu um potencial transitório mais do que o normal. Os mutantes foram então batizados de *trp*, para o receptor de potencial transitório. Duas décadas após, o gene *trp* foi clonado e mais tarde mostrou codificar um canal de cátion permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Montell e Rubin, 1989; Hardie e Minke, 1992).

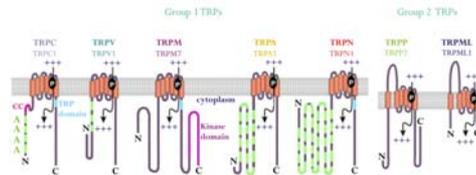
A identificação do primeiro homólogo TRP em mamíferos ocorreu 1995 e aumentou a busca por genes relacionados aos TRP, que resultou na identificação e caracterização de mais de 50 canais TRPs em levedura, vermes, insetos, peixes e mamíferos (Clapham, 2003; Voets et al., 2005).

Os canais TRPs são incomuns entre as famílias de canais iônicos, pois são canais polimodais, ou seja, são ativados por diversos mecanismos e variam na seletividade aos cátions. Estes canais podem ser considerados como integradores de sinais múltiplos, assim como a resposta a um impulso é modificada por outro. Não obstante, um aspecto comum dentro a superfamília é que os canais TRPs desempenham um papel importante em resposta a diferentes estímulos externos, incluindo luz, som, substâncias químicas, temperatura e toque e ainda possuem capacidade para sentir alterações locais, como alterações na osmolaridade e pH (Venkatachalam e Montell, 2007).

A superfamília de canais TRP está dividida em dois grupos: 1 e 2, os quais estão divididos em sete subfamílias. Uma oitava família, TRPY, consiste em um canal TRP de levedura, os quais foram remotamente relacionados com as outras famílias (Figura 2) (Palmer et al., 2001; Denis e Cyert, 2002; Venkatachalam e Montell, 2007).

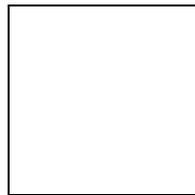
A separação do grupo 1 e 2 está baseada na seqüência e diferenças topológicas (Figura 2). O grupo 1 de canais TRPs consiste de 5 subfamílias, as quais apresentam uma forte homologia para os membros encontrados da superfamília *Drosophila* TRP

(Montell and Rubin, 1989). Esses canais mais relacionados com o TRP de *Drosophila* são referidos como clássicos ou TRPC. As subfamílias TRPV, TRPM, TRPA e TRPN são denominadas baseadas no nome original dado ao primeiro membro descrito de cada família. As duas subfamílias TRPP e TRPML compreendem o grupo 2 dos canais TRPs, os quais são remotamente relacionados ao grupo 1. Estes canais são proteínas que contêm uma grande alça de separação entre o primeiro e o segundo domínios transmembranas (Venkatachalam e Montell, 2007).



**Figura 2.** A superfamília TRPs. Representação de um único membro de cada família do grupo 1 e 2 (Montell, 2005).

A estrutura dos canais iônicos da família TRP (figura 3) é similar à de canais dependentes de voltagem, apresentando 6 domínios transmembranares. Acredita-se que esses canais formem tetrâmeros ligando os aminoácidos entre os segmentos S5 e S6 e formando o poro do canal (Clapham et al., 2001).

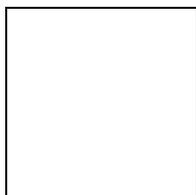


**Figura 3.** Estrutura de canais da família TRP (<http://www.scripps.edu/cb/patapoutian/bibliography.html>).

Os canais TRP são ativados por vários estímulos que incluem a ligação de ligantes extracelulares e intracelulares,

mudanças na temperatura, e estresse químico e/ou mecânico (osmótico) (Nilius et al., 2007).

Em 1997, Caterina e colaboradores clonaram o receptor vanilóide TRPV1 e descobriram que este canal é ativado por temperaturas acima de 43°C. Cinco outros canais ativados por temperaturas foram descritos: TRPV2, TRPV3 e TRPV4 ativados por temperaturas elevadas, e TRPM8 e TRPA1 ativados por temperaturas mais baixas (Figura 4) (Dhaka et al., 2006).



**Figura 4.** Canais TRPs ativados por diferentes faixas de temperatura e substâncias derivadas de produtos naturais (Dhaka et al., 2006).

A abertura dos canais TRPs provoca o influxo de íons cálcio. Estes íons, por sua vez, possuem papel central em muitos processos celulares incluindo contração muscular, liberação de transmissores, proliferação celular, transcrição genética e morte celular (Berridge et al., 2000). Os canais TRPs contribuem, então, para as mudanças na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre por agir nas vias de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática ou por mudar a polarização da membrana, modulando a força de direção para entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por vias alternativas. Estes canais provavelmente também formam vias intracelulares para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de várias organelas celulares (Nilius et al., 2007).

Foi descrito que os TRPs, na sua grande maioria, são permeáveis a cátions mono e divalentes, com exceção dos canais TRPM4 e TRPM5, os quais são somente permeáveis a cátions monovalentes. A maioria dos canais TRPs permeáveis aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , são fracamente seletivos para  $\text{Ca}^{2+}$ , com razão de permeabilidade relativa ao  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ) na faixa entre 0,3 e 10. As

exceções são os canais TRPV5 e TRPV6, dois canais TRPs altamente seletivos para  $\text{Ca}^{2+}$ , com  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$  (Nilius et al., 2007).

Evidências crescentes mostram que vários membros da superfamília dos TRPs participam na detecção de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Além disso, dados da literatura mostram que a hipersensibilidade à dor, que ocorre sobre várias condições patológicas, é frequentemente resultante de um aumento na expressão e/ou aumento da sensibilidade dos canais TRPs (Nilius et al., 2007).

### **1.3.1 Receptores de Potencial Transitório e dor**

O entendimento dos mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso tem progredido dramaticamente nos últimos anos, em grande parte devido a um aprimoramento na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia das fibras aferentes e no processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal (Grubb, 1998, Furst, 1999; Millan, 1999).

Durante a década passada, várias pesquisas têm revelado que membros da família de canais iônicos TRPs são moléculas fundamentais que detectam estímulos nocivos e transduzem uma ampla diversidade de estímulos químicos e físicos em potenciais de ação nos nociceptores somatossensoriais (Nilius et al., 2007).

O primeiro canal descoberto em neurônios sensoriais de mamíferos foi o Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 1 (TRPV1). Este canal é o receptor para a capsaicina, e também o receptor alvo para o calor nocivo ( $>42^{\circ}\text{C}$ ) (Caterina et al., 1997). O TRPV1 é encontrado em neurônios sensoriais nociceptivos de diâmetro médio e pequeno (fibras C) (Tominaga et al., 1998). Sua expressão em neurônios do gânglio da raiz dorsal, gânglio trigeminal e gânglio nodoso, particularmente em associação com outras fibras aferentes nociceptivas, junto com sua ativação pelo calor, ácido e compostos vanilóides pungentes, fortemente

indica seu papel importante na detecção e integração de estímulos nocivos. Análises em camundongos com deleção gênica para o receptor TRPV1 confirmaram que este canal contribui para estímulos químicos e térmicos (Caterina et al., 2000). Em particular, os camundongos com deleção gênica para o receptor TRPV1 mostraram respostas reduzidas aos estímulos de calor nocivo e completa indiferença à vanilóides pungentes. Portanto, a identificação do TRPV1 foi o maior catalisador que lançou os campos da pesquisa de transdução somatossensorial e dor para nível molecular.

O receptor TRP do tipo melastatina 8 (TRPM8) foi subsequentemente descoberto em 2002 e parece ser ativado por substâncias químicas que mimetizam a sensação de refrescância como o mentol e por frio não nocivo (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Este receptor está localizado em neurônios sensoriais de diâmetro médio e pequeno dentro dos gânglios trigeminais de raiz dorsal. Recentemente três estudos realizados, independentemente, em camundongos que não expressam o receptor TRPM8 sugerem que este canal está envolvido na transdução de sensações de refrescância e frio não nocivo em neurônios sensoriais de mamíferos (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Colburn et al., 2007; Stucky et al., 2009).

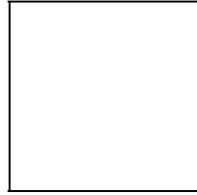
O receptor de potencial transitório relacionado a proteína anquirina do tipo 1 (TRPA1) é o único membro da subfamília das anquirinas encontrado em mamíferos. Originalmente chamado de ANKTM1, o receptor TRPA1 foi identificado cuidadosamente por Jaquemar e colaboradores em 1999 e por Story e colaboradores em 2003. Sua estrutura é distinta dos outros canais TRPs por ser o único membro com uma extensa cadeia de anquirinas (14 – 17) no domínio N terminal (Clapham, 2003). Os canais TRPA1 são expressos nos gânglios da raiz dorsal e neurônios trigeminais e em uma subpopulação de nociceptores não-mielinizados que também expressam o receptor TRPV1, sugerindo um importante papel na nocicepção. Sendo assim, este receptor é ativado por diversos compostos químicos pungentes ou irritantes incluindo aqueles encontrados no óleo de mostarda (alil isotiocianato), óleo de canela (cinamaldeído), gás (acroleína), cebola e alho (allicina) e formalina

(formaldeído), sendo que todos eles causam sensação dolorosa, como queimação ou alfinetada (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005; Bautista et al., 2006; McNamara et al., 2007). Além disso, os receptores TRPA1 foram descobertos como transdutores naturais para estímulos físicos, como força mecânica e frio nocivo ( $< 17^{\circ}\text{C}$ ) (Story et al., 2003; Corey et al., 2004). Um suporte indireto para a função termossensitiva do TRPA1 deriva de relatos recentes que animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 mostram uma diminuição na hipersensibilidade ao frio, subsequente à ligação de nervos espinhais em ratos (Katsura et al., 2006) e que o aumento da expressão deste canal em neurônios sensoriais, seguida de lesão e inflamação, contribui para a hipersensibilidade ao frio (Obata et al., 2005). E, finalmente, estudos usando antagonistas específicos de TRPA1 dão suporte para o entendimento do envolvimento deste canal na hipersensibilidade ao frio e mecânica resultantes de inflamação ou lesão de nervo (Petrus et al., 2008, da Costa et al., 2010).

#### **1.4 Linalol**

Desde a antiguidade, os produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, têm constituído importante fonte para obtenção de agentes terapêuticos. Além do uso clínico dos produtos naturais ou seus derivados para tratar doenças, estas substâncias são importantes ferramentas para a descoberta de novos alvos como receptores, enzimas, transportadores ou canais iônicos envolvidos em processos patológicos e fisiológicos (Calixto et al., 2005).

A medicina tradicional vem utilizando muitas espécies de plantas aromáticas para aliviar sintomas e curar uma variedade de doenças tanto agudas quanto crônicas. O (-)-linalol é um composto monoterpênico natural, comumente encontrado como o maior componente volátil de óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas (Figura 5). Dentre estas espécies estão a *Salvia sclarea* e a *Salvia desoleana* (Figura 6) (Peana et al., 1999).



**Figura 5.** Estrutura química do (-)-linalol



*S. sclarea*



*S. desoleana*

**Figura 6.** Plantas aromáticas que possuem como componente principal o (-)-linalol.

Estudos feitos em animais mostraram que os óleos essenciais destas plantas, após administração sistêmica, possuem atividade anti-inflamatória e analgésica periférica (Peana et al., 1999). Em 2002, Peana e colaboradores mostraram que a administração sistêmica de (-)-linalol e seu racemato, presentes em vários óleos essenciais destilados ou extraídos, reduziram o edema da pata induzido pela injeção de carragenina em ratos. O enantiômero puro produziu um efeito tardio e mais prolongado, enquanto que a forma racêmica significativamente reduziu o edema da pata somente uma hora após a administração de carragenina, sugerindo que espécies que produzem o (-)-linalol são potencialmente anti-inflamatórias (Peana et al., 2002). De acordo com estas observações, estudos feitos pelo mesmo autor (Peana et al., 2004b) mostraram que o (-)-linalol reduz de maneira dependente da dose a hipersensibilidade térmica produzida pela administração intraplantar de carragenina.

O primeiro relato sobre a atividade antinociceptiva do (-)-linalol foi publicado em 2003 por Peana e colaboradores, que mostraram que a administração de (-)-linalol em camundongos reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético nas doses de 25 até 75 mg/kg, administrados subcutaneamente (s.c.), sendo este efeito revertido pela administração de naloxona (5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)), um antagonista de receptor opóide, e atropina (5 mg/kg i.p.), antagonista de receptor muscarínico.

Estudos mostram que no teste da placa quente, um modelo utilizado para avaliar analgesia supraespinhal, somente a dose de 100 mg/kg via s.c. de (-)-linalol resultou num efeito significativo, sendo este efeito revertido pela atropina, porém não pela pirenzepina, um antagonista seletivo de receptores muscarínicos M1. A administração de sulpirida, antagonista de receptor dopaminérgico D2, reverte o efeito antinociceptivo do (-)-linalol no teste da placa quente, enquanto que o antagonista de receptor D1 da dopamina, SCH-23390, não foi capaz de ter este mesmo efeito. O pré-tratamento feito com glibenclamida, inibidor de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP, produz uma inibição da antinocicepção induzida pelo (-)-linalol. Em contraste, a naloxona, antagonista de receptores opióides, foi efetiva em animais tratados apenas com a maior dose

de linalol (150 mg/kg, s.c.) (Peana et al., 2004a). Além disso, foi demonstrado que antagonistas de receptores adenosinérgicos do tipo A1 e A2A também foram efetivos em reverter a ação antinociceptiva do (-)-linalol (25, 50 e 100 mg/kg, s.c.) no teste da placa quente (Peana et al., 2005). Estes dados sugerem que diferentes mecanismos estão envolvidos na ação antinociceptiva do (-)-linalol e que parecem ser dependentes da dose.

No teste de formalina, o (-)-linalol na dose de 150 mg/kg (s.c.) foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva nas fases inflamatória e neurogênica, porém as respostas da fase aguda são reduzidas apenas com doses mais baixas, sendo revertidas pelo bloqueio de receptores muscarínicos com a atropina e dos receptores opióides com a naloxona; por outro lado, o efeito do (-)-linalol não foi revertido pela pirezenpina, antagonista de receptores M1. A naloxona inibiu o efeito antinociceptivo do (-)-linalol (150 mg/kg) apenas na segunda fase do teste e o bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 com sulpirida ou dos canais de  $K^+$  com glibenclamida inibiu o efeito do (-)-linalol em ambas as fases do teste de formalina (Peana et al., 2004a). Portanto, o efeito deste composto nos sistemas de neurotransmissores, tais como colinérgicos M2, opióide e dopaminérgico D2, bem como o efeito em canais de potássio, pode resultar da estimulação indireta destas 3 famílias de receptores que são acopladas à proteínas  $G_i/G_o$  que são capazes de induzir à abertura de canais de  $K^+$  e, conseqüentemente, à hiperpolarização celular (Childers, 1991).

Estudos mostram que o linalol é um antagonista de receptores *N*-methyl-D-aspartato (NMDA) (Elisabetsky et al., 1999; Silva Brum et al., 2001 a,b) e a inibição da atividade de receptores NMDA produz antinocicepção (Coderre e Van Empel, 1994; Chizh et al., 2001), parcialmente mediada por opióides centrais (Forman, 1999). Peana e colaboradores (2004b) mostraram que a administração subcutânea de (-)-linalol (200 mg/kg) reverteu a hiperalgesia induzida por  $L$ -glutamato e também, reduziu a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar de prostaglandina E2 nas patas ipsi e contralateral (Peana et al., 2004b). A injeção intraplantar de prostaglandina E2 induz hiperalgesia na pata contralateral, o que sugere o envolvimento de

mecanismos centrais. Então, a eficácia do (-)-linalol pode estar relacionada ao efeito deste composto em diferentes sistemas de transmissão, tais como opióides, acetilcolina, dopamina, canais de  $K^+$  e glutamato, possivelmente envolvidos na hiperalgesia induzida pela prostaglandina E2. Além disso, linalol possui uma fraca atividade inibitória *in vitro* da colinesterase (Perry et al., 2000) e estudos mostram que a neurotransmissão muscarínica está envolvida na transmissão da antinocicepção na medula espinhal de ratos (Naguib e Yaksh, 1997).

Um estudo feito em macrófagos J774.A1 mostrou que a atividade antinociceptiva do (-)-linalol poderia estar relacionada com a inibição da liberação ou formação de óxido nítrico (NO), porém, esta atividade não sofre interferência com as vias das prostaglandinas, uma vez que o (-)-linalol inibiu o acúmulo de nitrito nos macrófagos J774.A1, estimulados com o lipopolissacarídeo (LPS); porém, não modificou a formação de PGE2 e COX2 (Peana et al., 2006).

Em modelo de dor neuropática de ligação do nervo espinhal (SNL), o pré-tratamento feito 1 hora antes da ligação, com uma única dose de (-)-linalol (100 mg/kg s.c.) não afeta a resposta nociceptiva aos estímulos mecânico e térmico induzidos pela neuropatia. Entretanto, a hipernocicepção mecânica é reduzida transitoriamente quando o (-)-linalol é administrado por 7 dias consecutivos, após a indução da neuropatia, porém, não foi vista nenhuma mudança na sensibilidade ao calor radiante nocivo (Berliocchi et al., 2009). Isto sugere que o (-)-linalol pode reduzir a hipersensibilidade mecânica somente na fase recente do desenvolvimento da sensibilização central, mas não é capaz de atenuar o comportamento nociceptivo durante o período de manutenção do estado doloroso. Neste mesmo estudo, Berliocchi e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento feito com (-)-linalol não afeta a expressão da proteína fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) – Akt e nem de IL-1 $\beta$  na medula espinhal seguida da ligação do nervo espinhal.

Interessantemente, existem dados descritos na literatura que demonstram que extratos de plantas que contêm 75% de (-)-linalol causam sensações de acidez e ardência (Riera et al., 2009),

as quais podem estar atribuídas à estimulação de receptores de potencial transitório (TRPs). Um estudo feito por Behrendt e colaboradores (2004) em cultura de células HEK293 transfectadas com TRPM8 mostrou que compostos quimicamente relacionados ao mentol, dentre eles o linalol (6,7 mM), produzem aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Atualmente, foi demonstrado que em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD), 500  $\mu\text{M}$  de linalol induz aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em neurônios, que responderam ambos à capsaicina (agonista de receptor TRPV1) e cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1). Porém, nenhuma mudança na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi evocada pelo linalol em neurônios puramente sensíveis à capsaicina ou mentol, sugerindo, então, que este composto ativa o receptor TRPA1 (Riera et al., 2009).

E por fim, outros autores têm relatado que o linalol modifica a cinética do receptor nicotínico na junção neuromuscular de camundongos (Re et al., 2000), possui atividade anestésica local (Ghelardini et al., 1999), efeito espasmolítico (Lis-Balchin e Hart, 1999) e uma fraca atividade inibitória *in vitro* da colinesterase (Perry et al., 2000). Ainda, Celik e Ozkaya (2002), mostraram que o linalol possui propriedades antioxidantes.

Assim, através de uma análise farmacológica *in vivo* e *in vitro*, o presente estudo procurou estender os dados encontrados na literatura sobre a ação antinociceptiva do (-)-linalol, através de um melhor entendimento do seu envolvimento com o sistema glutamatérgico e também analisar a participação dos receptores de potencial transitório (TRPs) no seu efeito antinociceptivo. Portanto, a continuidade das pesquisas com este composto pode fornecer uma perspectiva favorável para a maior compreensão dos efeitos farmacológicos e, também, para o desenvolvimento de um analgésico com efeito superior aos existentes atualmente na clínica.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Para que haja um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do (-)-linalol, o objetivo do trabalho foi aprofundar o conhecimento sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico e a possível participação dos receptores de potencial transitório (TRP) na ação antinociceptiva do (-)-linalol.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a atividade antinociceptiva do (-)-linalol no modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar e intratecal de glutamato em camundongos;
- ✓ Verificar o efeito do (-)-linalol sobre a performance locomotora de camundongos no teste de rota-rod;
- ✓ Analisar o efeito do (-)-linalol na nocicepção causada por agonistas de receptores glutamatérgicos, substância P e citocinas pró-inflamatórias em camundongos;
- ✓ Avaliar o efeito do (-)-linalol na nocicepção causada pela injeção intraplantar e intratecal de capsaicina ou cinamaldeído;
- ✓ Analisar o efeito do (-)-linalol sobre a hipernocicepção mecânica e térmica (quente), induzida pela administração intraplantar (i.pl) de cinamaldeído;
- ✓ Verificar, através de técnica de *Western blotting*, o efeito do (-)-linalol sobre a fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK na nocicepção causada pelo cinamaldeído;
- ✓ Avaliar o efeito do (-)-linalol na nocicepção causada pela administração intraplantar de éster de forbol (PMA), ativador da proteína quinase C (PKC);

- ✓ Avaliar o efeito da administração intraplantar de glutamato em animais com deleção gênica para os receptores TRPA1 (TRPA<sup>-/-</sup>), bem como verificar o efeito do (-)-linalol nesta nocicepção.
- ✓ Verificar o efeito da administração de inibidores competitivo (AP-5) e não-competitivo (MK801), de receptores NMDA na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído;
- ✓ Verificar o efeito do (-)-linalol no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de células CHO transfectadas com plasmídios contendo mTRPA1 e mTRPV1, estimuladas com alilisotiocianato ou capsaicina, respectivamente.
- ✓ Avaliar através de imagens de cálcio intracelular o efeito de diferentes concentrações de (-)-linalol em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos estimulados com alil isotiocianato (agonista TRPA1).
- ✓ Verificar o efeito do (-)-linalol no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal, estimulados com glutamato.
- ✓ Verificar o efeito do (-)-linalol na nocicepção crônica, tanto a induzida pela injeção (i.pl) de CFA (modelo de nocicepção inflamatória crônica), quanto a causada pela constrição parcial do nervo ciático (modelo de nocicepção neuropática) em camundongos;

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25 – 35 gramas) de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos em temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00) e com água e ração *ad libitum*. Foram também utilizados camundongos C57/Bl6 selvagens ou com deleção gênica para os receptores TRPA1 ou TRPV1 de ambos os sexos, obtidos do Laboratório da Dra. Gina Story da Washington University in St Louis (WUSTL). Os animais, machos e fêmeas, distribuídos de uma forma homogênea entre os grupos experimentais, foram mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo da dor com animais de laboratório (Zimmermann, 1983). Além disso, todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo PP0179) e pela Washington University in St Louis (protocolo: 20090220).

#### **3.2 Estudos comportamentais**

##### **3.2.1 Nociceção induzida pelo glutamato**

Para avaliar a participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do (-)-linalol, os camundongos foram pré-tratados com (-)-linalol pela via intraperitoneal (10 – 200 mg/kg, i.p.), oral (5 – 100 mg/kg, v.o.), intraplantar (10 – 300 ng/pata, i.pl.) e intratecal (0,1 – 3,0 µg/sítio, i.t.) 30, 60, 5 e 5 minutos, respectivamente, antes da injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µl de uma solução tamponada (pH 7,4) de glutamato (20 µmol/pata), de acordo com o método descrito anteriormente (Beirith et al, 2002,

Meotti et al., 2010). O grupo controle recebeu veículo pelas vias intraperitoneal (10 ml/kg, i.p.), oral (10 ml/kg, v.o.), intraplantar (20 µL/pata, i.pl.) e intratecal (5 µL/sítio, i.t.). Após a injeção de glutamato, os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada, durante 15 minutos, foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção.

### **3.2.2 Envolvimento dos receptores glutamatérgicos, citocinas pró-inflamatórias e substância P**

A fim de obter informações adicionais sobre a possibilidade dos receptores glutamatérgicos estarem envolvidos no mecanismo antinociceptivo do (-)-linalol, nesta série de experimentos, o efeito do linalol foi avaliado na nocicepção induzida pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos em camundongos, de acordo com o método descrito anteriormente (Scheidt et al., 2002). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intratecal de trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico, 8,3 µg/sítio), AMPA (agonista de receptores AMPA, 25 ng/sítio), glutamato (agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos, 30 µg/sítio), cainato (agonista de receptores do tipo cainato, 23,5 ng/sítio) ou NMDA (agonista de receptores NMDA, 25 ng/sítio). Para avaliar o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias e da SP no mecanismo de ação antinociceptivo do (-)-linalol, os animais receberam injeção intratecal de 5 µl de TNF- $\alpha$  (0,1 pg/sítio), IL-1 $\beta$  (1 pg/sítio) ou SP (135 ng/sítio). As doses de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram pré-determinadas com base em experimentos realizados em nosso laboratório (Lapa et al. 2009). Após a injeção das diferentes substâncias, os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção, durante os períodos apropriados para cada substância: glutamato (3 min); NMDA e substância P (5 min); AMPA (1 min); cainato (4 min) e trans-

ACPD, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (15 min). Os animais foram pré-tratados com (-)-linalol (50 ou 200 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes da injeção intratecal.

A injeção intratecal foi realizada em animais acordados usando o método descrito previamente por Hylden e Wilcox (1980). Brevemente, os animais foram manualmente contidos e uma agulha de calibre 30 conectada a uma microseringa de 25  $\mu$ l, foi inserida através da pele e entre as vértebras pelo espaço subdural dos segmentos L5-L6 da medula espinhal, foi injetado um volume de 5  $\mu$ L de solução.

### **3.2.3 Avaliação da atividade locomotora (Teste do Rota-Rod)**

Para avaliar algum efeito não específico como relaxante muscular ou sedativo do (-)-linalol, os camundongos foram submetidos ao teste de rota-rod. O aparato consiste de uma barra com 2,5 cm de diâmetro, subdividida em quatro compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. A barra gira a uma velocidade constante de 17 rotações por minuto. Os animais foram selecionados 24 horas, previamente, por eliminar aqueles que não permaneceram na barra por 3 períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais foram tratados com (-)-linalol (10 – 200 mg/kg i.p. ou 0,1 – 3  $\mu$ g/sítio, i.t.) ou veículo (10 ml/kg i.p. ou 5  $\mu$ l/sítio i.t.), 30 minutos (i.p.) e 10 minutos (i.t.) antes do teste.

### **3.2.4 Envolvimento dos receptores TRPA1**

Para avaliar a participação dos receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1 (TRPA1) no efeito do (-)-linalol, foi utilizado agonista TRPA1, cinamaldeído. Os camundongos foram colocados individualmente dentro de funis de vidro transparentes para adaptação, durante um período de, no mínimo 20 min, e, posteriormente, receberam injeção de 20  $\mu$ l de solução de cinamaldeído (10 nmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita, de acordo com o método descrito por Andrade et al. (2008).

Em seguida, foi cronometrado durante 5 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada.

O envolvimento de receptores TRPA1 localizados a nível medular no efeito do (-)-linalol, foi avaliada através da nocicepção induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído (3,97 nmol/sítio). A resposta nociceptiva (tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo) foi observada durante 5 minutos após a injeção intratecal de cinamaldeído. A injeção intratecal foi administrada como descrito no item 3.2.2 deste trabalho.

Os animais foram pré-tratados com (-)-linalol pela via i.p. (50 – 200 mg/kg), v.o. (10 – 200 mg/kg), i.pl. (10 – 300 ng/pata) ou intratecal (0,1 – 10 µg/sítio), 30, 60, 5 ou 5 minutos, respectivamente, antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com veículo (10 ml/kg i.p. ou v.o., 10 µl/pata ou 5 µl/sítio). Como controle do experimento, foi avaliada a resposta nociceptiva induzida pela administração i.pl. de cinamaldeído em camundongos com deleção gênica para os receptores TRPA1, e em animais selvagens tratados com AP-18 (antagonista TRPA1, 10 nmol/pata).

### **3.2.5 Envolvimento dos receptores TRPV1**

Para avaliar a participação dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide (TRPV1) na ação antinociceptiva do (-)-linalol, utilizou-se a capsaicina (agonista de receptores TRPV1). Os camundongos foram colocados individualmente dentro de funil de vidro transparente para adaptação, durante um período de no mínimo 20 min, e, posteriormente, receberam injeção de 20 µl de solução de capsaicina (5,2 nmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita, de acordo com o método descrito por Sakurada et al. (1996). Em seguida, foi cronometrado durante 5 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada.

O possível envolvimento dos TRPV1 espinhal na atividade antinociceptiva do (-)-linalol, foi avaliada através da nocicepção induzida pela injeção intratecal de capsaicina (100 pmol/sítio). A

resposta nociceptiva (tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo) foi observada durante 5 minutos após a injeção intratecal de capsaicina. A injeção intratecal foi administrada conforme descrito anteriormente no item 3.2.2 deste trabalho.

Os animais foram pré-tratados com (-)-linalol pela via i.p. (10 – 200 mg/kg), v.o. (10 – 200 mg/kg) ou i.pl. (10 – 100 ng/pata), 30 ou 60 minutos, respectivamente, para a via intraperitoneal e oral, antes da realização dos experimentos ou foram co-injetados com capsaicina intraplantarmente. Os grupos controles foram tratados com veículo (10 ml/kg i.p. ou v.o. ou 10µl i.pl.).

Em outra série de experimento, foi avaliada a resposta nociceptiva da administração i.pl. de capsaicina em camundongos com deleção gênica para os receptores TRPV1 e em animais selvagens tratados com capsazepina (antagonista TRPV1, 10 mg/kg, v.o).

### **3.2.6 Nociceção inflamatória crônica induzida pelo adjuvante completo de Freund**

Os camundongos foram tratados com 20 µL de CFA (Adjuvante completo de Freund, 1mg/ml de *Mycobacterium Tuberculosis* em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato mannide) subcutaneamente na superfície plantar da pata posterior direita. Para avaliar o efeito do tratamento agudo do (-)-linalol em relação à nociceção crônica induzida pela injeção de CFA (24 h após os animais receberem a injeção intraplantar de CFA), a hipernociceção mecânica foi avaliada imediatamente antes do tratamento (tempo 0) e em 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12 e 24 h após o tratamento com (-)-linalol (50 ou 200 mg/kg, i.p.). Para investigar os efeitos do tratamento prolongado dos camundongos com (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.), a administração foi realizada duas vezes por dia (durante 12 dias). A hipernociceção mecânica foi avaliada 4 h depois do primeiro tratamento diário (tempo da máxima inibição observada no tratamento agudo). O tratamento repetido se estendeu do 5º ao 10º dia após a injeção de CFA, sendo, então, interrompido

por 3 dias. Passados estes 3 dias, o tratamento foi reiniciado para avaliar aparecimento de uma possível tolerância causada pela (-)-linalol (Bortolanza et al., 2002).

### **3.2.7 Avaliação do edema de pata**

O edema de pata foi avaliado com um plestimômetro (modelo Ugo basile, Comerio, VA, Italy) em vários tempos diferentes, após a injeção de CFA. O edema de pata foi expresso em mililitros através da diferença de volume deslocado entre a pata direita e esquerda. Para avaliar o possível efeito terapêutico do (-)-linalol no edema de pata induzido pelo CFA, os animais receberam (-)-linalol (10 -200 mg/kg, i.p.) 24 horas após a injeção i.pl. de CFA. O aumento no volume das patas foi avaliado em 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12h depois da injeção de CFA (Paszczuk et al.,2007).

### **3.2.8 Neuropatia induzida pela ligação parcial do nervo ciático (LPNC)**

O possível efeito do (-)-linalol sobre a nocicepção neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia, induzida pela ligação parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura contendo cetamina 100 mg/kg e xilazina 5 mg/kg. Após a verificação da anestesia, foi realizada uma incisão no membro inferior direito para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes, de acordo com o método descrito para ratos (Seltzer et al., 1990) e adaptado para camundongos (Malmberg e Basbaum, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foram amarrados com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) que também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). Em camundongos sham (falsos operados), o nervo ciático foi exposto usando o mesmo procedimento cirúrgico, porém não foram ligados. Os camundongos com os nervos ligados não apresentaram sinais de autotomia. A hipersensibilidade foi avaliada

pela medida da hipernocicepção mecânica descrita no item 3.2.11. Camundongos lesionados receberam (-)-linalol (50 ou 200 mg/kg i.p.) ou veículo (10 ml/kg i.p.) e os animais falsos operados receberam somente veículo (10 mg/kg i.p.) 7 dias após a cirurgia. Para investigar os efeitos do tratamento crônico na hipersensibilidade mecânica, o (-)-linalol (50 mg/kg i.p.) foi administrado duas vezes ao dia (a cada 12 horas) por um período de 5 dias. O tratamento foi então interrompido por 3 dias e reiniciado após o terceiro dia para investigar o possível desenvolvimento de tolerância. A avaliação das respostas hipernociceptivas foi feita 4 horas após o primeiro dia de tratamento (tempo de inibição máxima observada no tratamento agudo).

### **3.2.9 Avaliação da hipersensibilidade ao estímulo frio**

Para avaliar o efeito do (-)-linalol na sensibilidade ao frio não nocivo em animais tratados com CFA, o estímulo ao frio da pata injetada com CFA foi feito de acordo com o procedimento proposto por Werner e colaboradores (2007), com algumas modificações. Brevemente, com o auxílio de uma seringa de insulina, cerca de 20 µl de acetona foram aplicadas a uma distância de 5 mm no meio da superfície plantar da pata posterior direita. A quantidade de tempo que o camundongo passou mordendo e/ou lambendo a pata, devido ao resfriamento causado pela evaporação da acetona, foi registrada com cronômetro durante 5 minutos após a aplicação da acetona, sendo usado como índice de responsividade ao estímulo frio. Um aumento significativo deste índice foi interpretado como um sinal de hipersensibilidade ao frio. Elevações da pata estimulada associadas com locomoção ou reposição do corpo, não foram contadas.

Em animais neuropáticos, a hipersensibilidade ao frio foi determinada usando uma Placa fria (Ugo Basile), com temperatura mantida a  $5,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , onde foram observados os comportamentos nociceptivos (tempo de mordida, lambida ou sacudida) e a latência da resposta da pata durante 5 minutos. Sete dias após a ligação parcial do nervo ciático, camundongos foram tratados com (-)-

linalol (100 mg/kg v.o.) ou veículo (10 ml/kg v.o.) 60 minutos antes do teste.

### **3.2.10 Avaliação da hipersensibilidade térmica ao estímulo quente**

O limiar hipernociceptivo (retirado da pata) foi avaliado por meio da aplicação de calor radiante, conforme descrito por Hargreaves e colaboradores (1988), adaptado para camundongos, na porção dorsal da pata tratada com cinamaldeído (30 nmol/pata). Decorrido o período de adaptação de 10 min, uma fonte radiante foi ativada sob as patas dos animais e o tempo dispendido para retirar a pata foi cronometrado automaticamente pelo aparelho (Hargreaves, Ugo Basile). O estímulo térmico radiante (luz infravermelha) foi direcionado para o meio da superfície plantar traseira dos animais, através da superfície de acrílico do assoalho da caixa de observação. O tempo transcorrido, entre o início da aplicação do estímulo e a manifestação de retirada da pata foi cronometrado automaticamente pelo aparelho (em segundos) e interpretado como o índice de limiar de retirada da pata à estimulação térmica. Reduções da latência de retirada da pata caracterizaram o aparecimento de hipersensibilidade ao calor. A intensidade da lâmpada infravermelha foi ajustada para 40 W para obter latências basais de respostas de retirada da pata de aproximadamente 12 segundos (s). O tempo máximo de 20 s de exposição ao estímulo térmico foi utilizado para evitar qualquer dano tecidual aos animais. O limiar de retirada da pata foi calculado como a média de resposta a 3 aplicações consecutivas, em intervalos de 5 minutos. Os animais foram pré-tratados com (-)-linalol (100 mg/kg v.o.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.) 60 minutos antes do teste. Para verificar a participação da proteína quinase JNK na hipersensibilidade ao calor, induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído, os animais foram pré-tratados com SP600125 (10 µg/pata i.pl.), antagonista de JNK, 5 minutos antes da injeção de cinamaldeído (30 nmol/pata).

### **3.2.11 Avaliação da hipernocicepção mecânica**

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan e colaboradores (1994). Através da superfície da tela de metal do assoalho da câmara de observação, uma série de filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças de 0.008, 0.002, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1, 2 and 4 g foram aplicados perpendicularmente e, em ordem crescente ou decrescente, ao centro da superfície plantar da pata traseira dos animais, por um período máximo de 5 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta nociceptiva de retirada da pata, seguida de lambida e/ou chocalhar da mesma. O teste teve início com o filamento de 0,04 g. Na ausência de resposta, filamentos de força maior foram aplicados, consecutivamente, até que ocorresse a resposta de retirada da pata. Caso o filamento de 0,04 g produzisse a resposta, após um intervalo de 2 minutos, filamentos de força menor eram aplicados até que ocorresse novamente a resposta de retirada da pata. Os dados coletados utilizando este método, denominado *up-and-down* e proposto por Dixon (1980), foram utilizados para calcular a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas, g). Reduções no limiar de retirada da pata caracterizaram o aparecimento de hipernocicepção mecânica.

### **3.2.12 Envolvimento da proteína kinase C (PKC)**

A proteína kinase C (PKC) é conhecida ser o principal alvo para a ação do acetato miristato de forbol (PMA) ou éster de forbol. Então, para avaliar o envolvimento da proteína kinase C (PKC) na ação antinociceptiva do (-)-linalol, cada animal recebeu uma injeção de 20 µl de solução de PMA (50 pmol/pata) na pata posterior direita e foi avaliado o tempo que o animal lambeu e/ou mordeu a pata injetada, 15 minutos após a injeção de PMA, durante 30 minutos, conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2005). Os animais foram tratados com (-)-linalol (25 – 100 mg/kg v.o.) ou veículo (10 ml/kg v.o.) 60 minutos antes da injeção de PMA.

### 3.3 Estudos in vitro

#### 3.3.1 Análise da fosforilação de MAPKs

Neste experimento foi avaliado o efeito do (-)-linalol na possível fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), induzidas após a injeção intraplantar ou intratecal de cinamaldeído. Brevemente, os animais foram pré-tratados com (-)-linalol (100 mg/kg v.o.) 60 minutos. Após este período, os animais receberam injeção intraplantar (30 nmol/pata) ou intratecal (3,97 nmol/sítio) de cinamaldeído. Quatro horas após a injeção de cinamaldeído, os animais foram mortos por descolamento cervical e os tecidos das patas ipsilaterais e as porções L5-L6 das medulas espinhais, foram removidos e mantidos a -80°C para posterior análise em Western Blotting.

Aproximadamente 50 µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrados (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3%), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membranas de polivinilideno difluorido (PVDF). Para bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas “overnight” em solução de TBS-T, contendo leite desnatado (5%) a 4 °C, lavadas em tampão TBS-T e então incubadas “overnight” com os anticorpos primários contra as formas total e fosforiladas das enzimas kinase, regulada por mitógeno (ERK), p38 e JNK (Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

### **3.3.2 Cultura de células e expressão gênica.**

#### **3.3.2.1 Preparação de culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal**

Os neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) de camundongos adultos foram cultivados conforme descrito por Story et al., 2003. Brevemente, os neurônios do GRD foram rapidamente dissecados e colocados em uma placa contendo 1 mL de meio Hams F12/DMEM com 10% de soro de cavalo, Pen/strep (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e L-glutamina (2mM). Foram adicionados 1,25% de colagenase tipo IV e incubado durante 1 hora a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio contendo colagenase foi removido e os gânglios foram lavados com meio livre de soro. As células foram transferidas para um cubo cônico e centrifugadas durante 30 segundos. Após, foram adicionados 1,25 U de solução de papaina em Ham's F12/DMEM livre de soro e mantidas por 30 minutos a 37°C. As células foram então centrifugadas a 1000 rpm durante 1 minuto. O meio contendo papaina foi removido e adicionado meio contendo soro; os gânglios foram ressuspensos e dissecados mecanicamente várias vezes utilizando pipetas de diferentes aberturas. Após esta etapa, foram adicionados cuidadosamente 15% de BSA e centrifugados durante 10 minutos a 1000 rpm. As células instalaram-se no fundo do tubo e as lâminas de BSA, fragmentos celulares e meio foram retirados. A seguir, foram adicionadas alíquotas frescas de 10 µM AraC (citosina beta-D-arabinofuranosídeo) para impedir o crescimento de células não neuronais, 100 ng/mL NGF e 10 ng/mL BDNF para manter as células vivas e saudáveis. As células (cerca de 14.500 neurônios) foram plaqueadas em lamínulas de vidro transparente (de aproximadamente 25 mm de diâmetro) previamente tratadas com poli-L-lisina (8,3 mM) e laminina (5 mM) e mantidas 24 horas a 37°C.

### **3.3.2.2 Preparação de cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal**

Os neurônios do corno dorsal da medula espinhal foram preparados utilizando-se camundongos de 2-5 dias de idade. Brevemente, os cornos dorsais foram dissecados em um tampão contendo uma solução salina balanceada Hank's (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,0 mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>) adicionados 10 mM de HEPES sobre uma placa de Petri gelada. Os tecidos conectivos foram removidos e adicionados a eles uma solução de 45 µL de papaina para digestão por 20 minutos. Em seguida, os neurônios foram então transferidos para um tubo contendo 5 mL de tampão e lavados 3 vezes com tampão. Logo após, o tecido foi lavado 1 vez com 1 mL de meio de cultura neurobasal A suplementado com NaCl 1 M, soro fetal bovino 2% (FBS), soro de cavalo 2%, glutamax 2mM e B-27 1%. Os tecidos foram, então, triturados mecanicamente 6 – 7X, o sobrenadante foi removido e filtrado com um filtro celular de 40 µm. Este procedimento foi repetido até se obter um total de 4 mL. Após esta etapa, o homogenato foi centrifugado por 1000 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante removido. Foi adicionado 1 mL de meio de cultura e as células contadas utilizando um hemacitômetro. As células foram plaqueadas adicionando-se aproximadamente 100 µL (dependendo da densidade desejada) em cada lamínula e então incubadas. Trinta minutos após foram adicionados 900 µL de meio de cultura em cada lamínula e foram mantidas por até 7 dias, sendo que o meio foi trocado a cada 3 dias.

### **3.3.2.3 Transfecção de células CHO**

Um dia antes da transfecção, as células de ovário de camundongo chinês (CHO) foram plaqueadas (0,5 – 2,0 x 10<sup>5</sup> células em 1 mL de meio Ham's F12 com 10% de FBS) para que alcançassem cerca de 90 – 95% de confluência, até o momento da transfecção. Em seguida, 1 µg de DNA foi diluído em 50 µL de meio Opti-MEM sem soro e homogeneizado gentilmente. Antes do uso, o reagente Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 foi gentilmente misturado e,

então, a quantidade apropriada (1  $\mu\text{L}$  por pocinho) foi diluída em 50  $\mu\text{L}$  de meio Opti-MEM sem soro e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação, o DNA diluído foi adicionado à mistura de Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 100  $\mu\text{L}$  da mistura foram adicionados em cada pocinho contendo células e meio de cultura. As células foram então incubadas por 24 – 48 horas a 37°C em uma estufa contendo  $\text{CO}_2$  antes do teste.

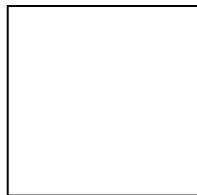
### 3.3.3 Medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Após 24 horas de incubação dos neurônios do GRD ou do corno dorsal, ou ainda, 24 a 48 horas após a incubação das células CHO, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com tampão Hank's (Hank's contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e livre de  $\text{Mg}^{2+}$ , 10mM de HEPES) e, então, adicionados 2 mL do tampão. O Fura-2 foi ressuspenso em DMSO e adicionado um volume igual de ácido plurônico. Foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  da mistura (Fura-2 com ácido plurônico) em cada lamínula e incubados à temperatura ambiente por uma hora, para células CHO e 30 minutos para cultura de neurônios. Após os períodos de incubação, o tampão foi removido e as células lavadas uma vez com tampão Hank's. Foi adicionado, então, 0,5 mL de tampão e as células foram incubadas por, pelo menos, 30 minutos antes do teste para permitir a deesterificação do Fura-2 metil éster. As lamínulas foram posicionadas no microscópio Leica DMI 6000 B e excitadas em filtro Fura-2 a 340 nm e 380 nm usando uma lâmpada XENON para indicar mudanças relativas na concentração de cálcio intracelular. A fluorescência emitida foi registrada utilizando-se a razão F340/F380, capturada e processada por um sistema de análise de imagem dinâmica, utilizando o programa BD IPLab (BD Biosciences, Rockville, MD, EUA). Os sinais fluorescentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de cada célula foram registrados continuamente, em intervalos de 1 segundo, durante toda a duração do experimento. As soluções contendo as substâncias teste e seus respectivos veículos foram perfundidas diretamente na câmara

### 3.3.4 Protocolos experimentais utilizados para obtenção dos efeitos do (-)-linalol em culturas celulares

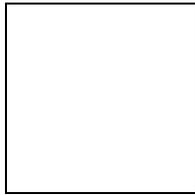
#### 3.3.4.1 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos

Utilizando um sistema de perfusão, as células foram primeiramente lavadas com tampão Hanks (contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e livre de  $\text{Mg}^{2+}$  adicionado 10 mM de HEPES) por 30 segundos. Após estabilização, (-)-linalol (50, 100 ou 250  $\mu\text{M}$ ), MK801 (100  $\mu\text{M}$ ) ou veículo foram perfundidos por 60 segundos. As células foram lavadas novamente com tampão e então adicionado (-)-linalol, MK801 ou veículo, novamente por um período de 1 minuto. Após, as células foram ativadas com AITC (100  $\mu\text{M}$ ) durante 2 minutos. Os neurônios em cultura foram lavados com tampão por 1 minuto e, então, adicionado KCl (50 mM) (Figura 7).



**Figura 7.** Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.

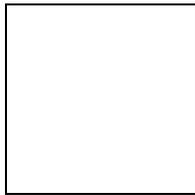
Para verificar o efeito do (-)-linalol na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , os neurônios foram lavados com tampão Hanks (contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e livre de  $\text{Mg}^{2+}$ , adicionados 10 mM de HEPES) por 30 segundos. Após estabilização, o (-)-linalol (500  $\mu\text{M}$ ) ou veículo, foram perfundidos por 60 segundos. As células foram lavadas novamente com tampão e então, adicionado mentol (agonista TRPM8) durante 1 minuto; a solução foi lavada durante 1 minuto e foi adicionado AITC (50  $\mu\text{M}$ ) por mais 1 minuto. A solução de AITC foi lavada com tampão durante 1 minuto e, finalmente, adicionou-se capsaicina (1  $\mu\text{M}$ ) durante mais 1 minuto (Figura 8).



**Figura 8.** Representação esquemática da avaliação do efeito do (-)-linalol (500  $\mu\text{M}$ ) em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.

#### **3.3.4.2 Cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos**

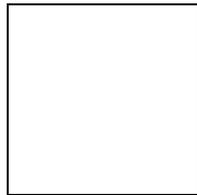
Utilizando-se um sistema de perfusão, as células foram primeiramente lavadas com tampão Hanks (contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e livre de  $\text{Mg}^{2+}$  adicionado 10 mM de HEPES) por 30 segundos. Após estabilização, (-)-linalol (100 ou 500  $\mu\text{M}$ ) ou veículo foram perfundidos por 60 segundos. As células foram lavadas novamente com tampão e, então, adicionado (-)-linalol ou veículo, novamente, por um período de 1 minuto. Após, foi adicionado glutamato (100  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$  de glicina) juntamente com (-)-linalol ou veículo, durante 1 minuto. Os neurônios em cultura foram lavados com tampão por um minuto e, então, adicionado KCl (50 mM) (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos.

### 3.3.4.3 Cultura de células CHO transfectadas com receptores TRPA1 ou TRPV1

Utilizando um sistema de perfusão, as células CHO transfectadas com receptores TRPA1 ou TRPV1 foram primeiramente lavadas com tampão Hanks (contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  adicionado 10 mM de HEPES) por 60 segundos. Após estabilização, foi adicionado AITC (100  $\mu\text{M}$ ) ou capsaicina (1  $\mu\text{M}$ ) durante 2 ou 1 minuto, respectivamente. As células foram novamente lavadas (1 minuto) e, após foi adicionado (-)-linalol (50, 100, 250 ou 500 $\mu\text{M}$ ) ou veículo. Os neurônios em cultura foram lavados com tampão por mais 1 minuto (Figura 10).



**Figura 10.** Representação esquemática das perfusões feitas em cultura de células CHO transfectadas para expressarem os receptores TRPA1 ou TRPV1.

### 3.4 Análise Estatística

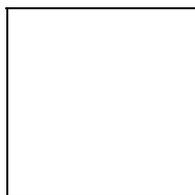
Os resultados foram expressos como média + E.P.M. A diferença entre os grupos foi obtida pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Valor de p menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado como indicativo de significância. O valor de  $\text{DI}_{50}$  para os experimentos de curva dose resposta foi determinado através da interpolação gráfica dos experimentos individuais, usando o programa GraphPad (1994, San Diego, CA). As porcentagens de inibição representam a média  $\pm$  E.P.M. das inibições máximas individuais obtidas para cada experimento. Os resultados referentes

à hipernocicepção mecânica e térmica foram analisados com ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida do teste *U* de Mann-Whitney, usando o programa Stata versão 11.0 (Stata Corp, Texas, EUA).

## 4. Resultados

### 4.1 Comparação entre as respostas nociceptivas nas duas linhagens de camundongos utilizadas neste estudo

Para avaliar o efeito antinociceptivo do (-)-linalol, inicialmente foram comparadas as repostas nociceptivas induzidas pela injeção intraplantar de glutamato (20  $\mu$ mol/pata) ou cinamaldeído (10 nmol/pata) em duas linhagens diferentes de camundongos: C57/Bl6J e Swiss. A injeção intraplantar das substâncias algogênicas induziram respostas nociceptivas, caracterizadas por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo que, não foi observada diferença significativa desta resposta entre as linhagens de camundongos utilizadas neste estudo (Figura 11 A e B).

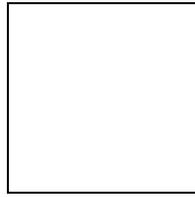


**Figura 11.** Efeito nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de glutamato (A, 20  $\mu$ mol/pata) ou de cinamaldeído (B, 10 nmol/pata) em camundongos C57/Bl6J e Swiss. O eixo vertical representa a resposta nociceptiva, observada em segundos para as diferentes linhagens de animais e, cada coluna, representa a média de seis animais  $\pm$  EPM.

### 4.2 Efeito antinociceptivo do (-)-linalol no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

Assim, para confirmar a ação antinociceptiva do (-)-linalol, utilizou-se do teste do glutamato. Os resultados apresentados na Figura 12 (A, B e C) mostram que o (-)-linalol administrado sistemicamente (i.p. ou v.o.) (50 – 200 mg/kg) ou centralmente (i.t.,

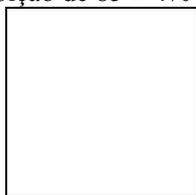
0,1 – 3  $\mu\text{g/sítio}$ ), reduziu, significativamente, e de maneira dependente da dose, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os valores de  $\text{DI}_{50}$  obtido para a via i.p., v.o. e i.t. foram de 139,1 (107,3 – 180,4) mg/kg, 34,6 (23,3 – 51,9) mg/kg e 0,9 (0,2 – 2,4)  $\mu\text{g/sítio}$ , com inibições de  $70 \pm 4$ ,  $72 \pm 7$  e  $74 \pm 8\%$ , respectivamente. Por outro lado, o (-)-linalol (100 – 300 ng/pata), co-administrado pela via intraplantar com o glutamato, inibiu parcialmente ( $49 \pm 9\%$ ), porém, de forma significativa, a nocicepção induzida pela injeção de glutamato intraplantar (Figura 12 D).



**Figura 12.** Efeito do (-)-linalol administrado intraperitonealmente (A), oralmente (B), intratecalmente (C) e intraplantarmente (D) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20  $\mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. O eixo vertical representa a resposta nociceptiva observada em segundos para os diferentes tratamentos e, cada coluna representa a média de seis a oito animais  $\pm$  EPM. Os valores do controle (C) indicam os animais tratados com veículo e os asteriscos denotam níveis de significância \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ , quando comparados com os valores dos grupos controles (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

### 4.3 Efeito antinociceptivo do (-)-linalol no modelo de nociceção induzida pela injeção intratecal de glutamato, agonistas de receptores glutamatérgicos, SP e citocinas pró-inflamatórias

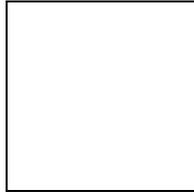
O próximo passo foi verificar qual o receptor glutamatérgico específico estaria envolvido na ação antinociceptiva do (-)-linalol. A Figura 13 mostra que a administração de (-)-linalol (200 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir, de forma significativa, a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de glutamato, AMPA, NMDA e cainato com inibições de  $89 \pm 6\%$ ,  $73 \pm 11\%$ ,  $98 \pm 2\%$  e  $52 \pm 15\%$ , respectivamente. Entretanto, o mesmo tratamento dos animais com linalol não preveniu a resposta nociceptiva induzida pelo agonista de receptor glutamatérgico do tipo metabotrópico *trans*-ACPD. Uma importante interação entre glutamato e SP tem sido bem documentada na literatura. Portanto, hipotetizou-se que a SP poderia participar no mecanismo de ação antinociceptivo do (-)-linalol. Verificou-se que o (-)-linalol inibiu de forma significativa a nociceção causada pela injeção i.t. de SP, com inibição de  $85 \pm 4\%$  (Figura 13).



**Figura 13.** Efeito do (-)-linalol (200 mg/kg, i.p., administrado 30 min antes) na resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato (30  $\mu$ g/sítio), NMDA (25 ng/sítio), AMPA (25 ng/sítio), cainato (23,5 ng/sítio), *trans*-ACPD (8,6  $\mu$ g/sítio) e substância P (SP) (135 ng/sítio) em camundongos. O eixo vertical representa a resposta nociceptiva (s) obtida para cada substância algogênica e, cada coluna representa a média de oito a dez animais  $\pm$  E.P.M.. Os asteriscos denotam níveis de significância \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparados com os valores dos

grupos controles (tratados com veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

Numa outra série de experimentos, foi investigado o efeito do (-)-linalol na resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de citocinas pró-inflamatórias. O (-)-linalol administrado intraperitonealmente (50 ou 200 mg/kg) causou inibição significativa e dependente da dose das respostas nociceptivas induzidas pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . As inibições foram de 72  $\pm$  12% e 63  $\pm$  8% na nocicepção induzida por IL-1 $\beta$ , respectivamente para as doses de 200 e 50 mg/kg e 94  $\pm$  3% e 41  $\pm$  8% na nocicepção induzida por TNF- $\alpha$ , respectivamente (Figura 39).

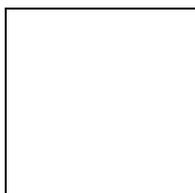


**Figura 14.** Efeito da administração aguda de (-)-linalol (50 ou 200 mg/kg, i.p.) na resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de IL-1 $\beta$  (1,0 pg/sitio) ou TNF- $\alpha$  (0,1 pg/sitio) em camundongos. Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 – 10 animais por grupo e as linhas verticais, o tempo em que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a região posterior do corpo. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  denotam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (animais tratados com veículo) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.4 Efeito do (-)-linalol no teste do rota-rod

A avaliação do equilíbrio e da coordenação motora, através do teste de rota-rod, mostrou que o (-)-linalol administrado pela via

intraperitoneal (10, 50, 100 e 200 mg/kg) ou intratecal (0,1; 0,3; 1 e 3  $\mu\text{g/sítio}$ ) não afetou a performance locomotora dos animais, quando comparado com aqueles que foram tratados com veículo (grupo controle). As resposta observadas (médias  $\pm$  E.P.M) foram de  $160,0 \pm 4,0$ ;  $176,0 \pm 2,5$ ;  $178,0 \pm 2,0$  e  $180,0 \pm 0,0$  segundos para os grupos tratados pela via i.p. e controle respectivamente e,  $179,7 \pm 0,3$ ;  $180,0 \pm 0,0$ ;  $155,3 \pm 24,7$ ;  $117,0 \pm 30,5$  e  $179,7 \pm 0,3$  segundos para os grupos tratados pela via intratecal e controle, respectivamente (Figura 15).



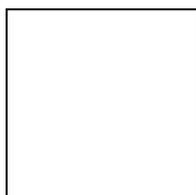
**Figura 15.** Efeito do (-)-linalol administrado pela via intraperitoneal (A, 10, 50, 100 e 200 mg/kg, 30 min antes) e intratecal (B, 0,1; 0,3; 1 e  $\mu\text{g/sítio}$ , 10 min antes) sob o desempenho motor de camundongos avaliados no teste do rota-rod. O eixo vertical indica o tempo em que o animal permaneceu na barra (s) para os diferentes tratamentos e, cada coluna representa a média de seis animais  $\pm$  E.P.M.

#### 4.5 Envolvimento dos receptores de potencial transitório (TRPs)

##### 4.5.1 Efeito antinociceptivo do (-)-linalol na nociceção induzida por agonistas TRPA1 ou TRPV1

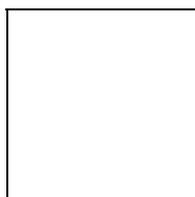
A próxima pergunta foi verificar o envolvimento dos receptores TRPs na ação antinociceptiva do (-)-linalol. A figura 16 demonstra que a injeção i.pl. de cinamaldeído, conforme esperado,

não causou uma resposta nociceptiva em animais com deleção gênica para o TRPA1<sup>-/-</sup> e a co-administração de AP-18 (10 nmol/pata, antagonista TRPA1) reduziu de maneira significativa a nocicepção induzida pelo cinamaldeído em animais selvagens. A administração de (-)-linalol, em animais selvagens, pela via sistêmica (i.p. e oral), central (i.t.) e periférica (i.pl.), foi capaz de inibir de forma significativamente e dependente da dose, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (10 nmol/pata). Os valores de DI<sub>50</sub> encontrados foram 99,7 (83,1 – 119,8) mg/kg, 121,27 (83,09 – 177,01) mg/kg, 26,4 (21,8 – 33,1) ng/pata e 3,6 (3,4 – 3,8) µg/sítio, com inibições de 86 ± 4%, 56 ± 5%, 87 ± 4% e 62 ± 8%, respectivamente para a via i.p., v.o., i.pl. e i.t. (Figura 16).



**Figura 16.** Efeito do (-)-linalol, administrado intraperitonealmente (A, 30 min antes), oralmente (B, 60 min antes), intraplantarmente (C) ou intratecalmente (D, 10 min antes), na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (10 nmol/pata) em camundongos. Como controles positivos do teste foram usados um antagonista de receptor TRPA1, AP-18 (10 nmol/pata) e animais com deleção gênica para os receptores TRPA1<sup>-/-</sup> (KO). O eixo vertical representa a resposta nociceptiva observada em segundos para os animais KO e animais selvagens submetidos aos diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de seis a dez animais ± E.P.M. Os asteriscos denotam níveis de significância \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 quando comparados com os valores dos grupos controles (tratados com veículo) (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

Em outro experimento, investigou-se a participação do TRPV1 na ação antinociceptiva do (-)-linalol. A Figura 17 demonstra que, conforme esperado, a injeção intraplantar de capsaicina (5,2 nmol/pata) em animais que não expressam o receptor TRPV1, não causou uma resposta nociceptiva e, em animais selvagens, o pré-tratamento feito 60 minutos antes com capsazepina (10 mg/kg v.o.) reduziu, de maneira significativa e dependente da dose, a nocicepção induzida pela capsaicina (Figura 17 A). Além disso, a administração de (-)-linalol pela via sistêmica (intraperitoneal e oral), reduziu de maneira parcial a nocicepção induzida pela capsaicina (5,2 nmol/pata). O valor de  $DI_{50}$  encontrado para a via oral foi de 190,7 (140 – 259) mg/kg e inibição de  $53 \pm 7\%$ . Entretanto, a administração de (-)-linalol pela via intraplantar, não foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina (Figura 17).

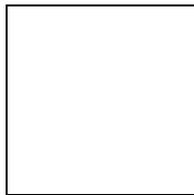


**Figura 17.** Efeito do (-)-linalol, administrado intraperitonealmente (A, 30 min antes), oralmente (B, 60 min antes) ou intraplantarmente (C), na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (5,2 nmol/pata) em camundongos. Como controles positivos do teste foram usados animais com deleção gênica para os receptores

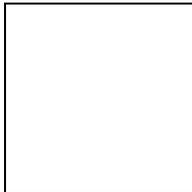
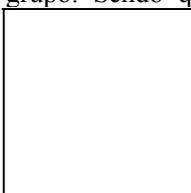
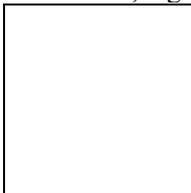
TRPV1<sup>-/-</sup> (KO). O eixo vertical representa a resposta nociceptiva observada em segundos para os animais KO e animais selvagens submetidos aos diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de oito animais  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos denotam níveis de significância \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparados com os valores dos grupos controles (tratados com veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.5.2 Efeito antinociceptivo do (-)-linalol na hipernociceção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

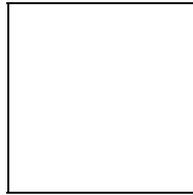
O efeito do (-)-linalol foi analisado na hipersensibilidade térmica (calor) induzida por cinamaldeído. Assim, primeiramente foi demonstrado que a injeção intraplantar de cinamaldeído (10 e 30 nmol/pata) em camundongos, causa hipersensibilidade térmica ao calor, de maneira dependente do tempo e da dose, quando comparado com o grupo controle (Figura 18). Então, a partir deste experimento, a dose de cinamaldeído escolhida para avaliar o possível efeito do (-)-linalol nesta hipersensibilidade ao calor, foi a de 30 nmol/pata.



**Figura 18.** Dercurso temporal da hipernociceção ao calor, induzida pela injeção intraplantar de diferentes doses de cinamaldeído em camundongos. O eixo vertical representa a latência de retirada da pata (em segundos) frente ao calor nocivo pelo tempo (em horas). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de

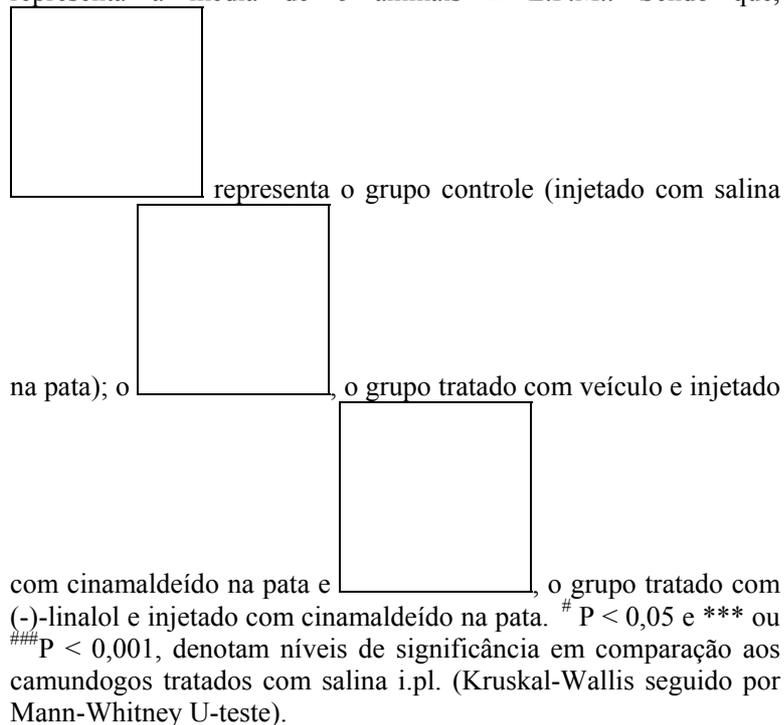
6 animais por grupo. Sendo que,  representa o grupo controle;  o grupo tratado com 10 nmol/pata de cinamaldeído e  o grupo tratado com 30 nmol/pata.\* P < 0,05 e \*\*\* P < 0,001 denotam os níveis de significância em comparação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney U-teste).

A Figura 19 mostra que o pré-tratamento dos animais com o (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) não foi capaz de reduzir a hipernocicepção ao estímulo de calor, induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.



**Figura 19.** Efeito do (-)-linalol (100 mg/kg, v.o. 60 min antes) na hipernocicepção ao estímulo de calor, induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (30 nmol/pata) em camundongos. O

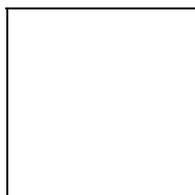
eixo vertical representa a latência de retirada da pata (em segundos) frente ao calor nocivo pelo tempo (em horas). Cada ponto representa a média de 6 animais  $\pm$  E.P.M.. Sendo que,



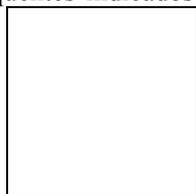
Foi verificado que a injeção de cinamaldeído (30 nmol/pata) também foi capaz de induzir um aumento na sensibilidade aos monofilamentos de Von Frey, caracterizando a hipersensibilidade mecânica. Porém, a administração de (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) inibiu completamente a hipersensibilidade mecânica, 4 horas após a administração de cinamaldeído, sendo que este efeito perdurou por até 6 horas (Figura 20).

Para avaliar se a JNK está envolvida no efeito hipernociceptivo do cinamaldeído, os camundongos foram tratados com o inibidor da JNK (SP600125, 10  $\mu$ g/pata) que, por sua vez,

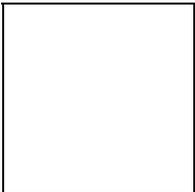
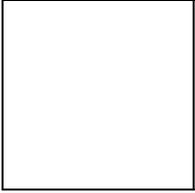
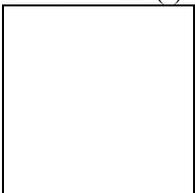
causou um bloqueio significativo da hipernocicepção mecânica induzida por cinamaldeído intraplantar (30 nmol/pata) (Figura 20).



**Figura 20.** Efeito da administração de (-)-linalol (100 mg/kg, v.o. 60 min antes) e do inibidor da JNK (SP 600125, 10 µg/pata) na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (30 nmol/pata) em camundongos. O eixo vertical representa o limiar de retirada da pata (em gramas) pelo tempo (em horas). Cada ponto representa 50% do limiar de retirada da pata (em gramas) ± E.P.M. para o estímulo tátil da pata traseira ipsilateral, antes da injeção de cinamaldeído (basal, B) ou nos tempos subsequentes indicados de 6 – 10 camundongos por grupo. Sendo



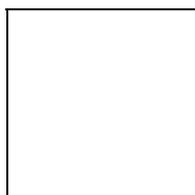
que, o [ ] representa o grupo controle (injetado com

salina na pata); o , o grupo tratado com veículo e  
injetado com cinamaldeído na pata; , o grupo  
tratado com (-)-linalol e injetado com cinamaldeído na pata e o  
, os que foram tratados com SP 600125 e  
cinamaldeído na pata. \* e #P < 0,05 e \*\*\* e ###P < 0,001, denotam  
níveis de significância em comparação aos camundongos tratados  
com veículo (100 ml/kg v.o.) e salina i.pl.(Kruskal-Wallis seguido  
por Mann-Whitney U-teste).

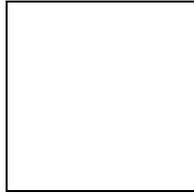
#### 4.6 Envolvimento das proteínas quinases

A partir destes resultados, o próximo passo foi verificar o efeito do (-)-linalol na sinalização celular. Assim, para verificar o envolvimento de proteínas quinases na ação antinociceptiva do (-)-linalol, foram feitas análises, através de técnicas de Western blot, das formas totais e fosforiladas das MAPKs: p38<sup>MAPK</sup>, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e quinase c-Jun amino-terminal (JNK) dos tecidos das patas e medula (porção L5 – L6) de camundongos, injetadas com cinamaldeído (30 nmol/pata). O pré-tratamento com (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) preveniu o aumento da

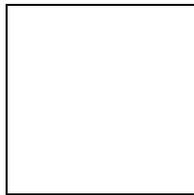
forma fosforilada da JNK na pata injetada com cinamaldeído (Figura 21 B), porém, o mesmo tratamento não foi capaz de reduzir a fosforilação da ERK e da p38<sup>MAPK</sup> induzida pelo cinamaldeído (Figuras 22B e 23B). Por outro lado, a injeção de cinamaldeído não induziu fosforilação da JNK, ERK e da p38<sup>MAPK</sup> na medula (porção L5-L6) (Figuras 21 A, 22 A e 23 A).



**Figura 21.** Efeito do (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) na fosforilação da p38MAPK, na medula espinhal (A) e na pata (B), induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído (30 nmol/pata) em camundongos. Cada barra representa a média de 6 animais  $\pm$  E.P.M. Os dados são expressos como a razão entre as formas fosforiladas e total da p38MAPK. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA de uma via, seguida por teste de Newman- keuls.

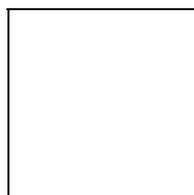


**Figura 22.** Efeito do (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 ml/kg v.o., grupo controle) na fosforilação da ERK, na medula espinhal (A) e na pata (B), induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído (30 nmol/pata) em camundongos. Cada barra representa a média de 6 animais  $\pm$  E.P.M. Os dados são expressos como a razão entre as formas fosforiladas e total da ERK. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA de uma via seguida por teste de Newman- keuls.



**Figura 23.** Efeito do (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 ml/kg v.o., grupo controle) na fosforilação da JNK, em medula espinhal (A) e na pata (B), induzida 4 horas após a injeção intraplantar de cinamaldeído (30 nmol/pata) em camundongos. Cada barra representa a média de 6 animais  $\pm$  E.P.M. Os dados são expressos como a razão entre as formas fosforiladas e total da JNK. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA de uma via, seguida por teste de Newman- keuls. \*\*\* $p < 0,001$ , denota nível de significância em comparação com o grupo tratado com veículo.

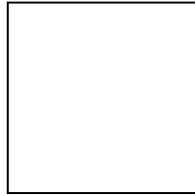
Para estender nossos dados, foi verificado a participação dos receptores TRPA1 centrais na ação antinociceptiva do (-)-linalol. Assim, primeiramente foi demonstrado que a injeção intratecal de cinamaldeído (1,98, 3,97 ou 7,94 nmol/sítio) induziu comportamento nociceptivo dependente da dose, caracterizada por lambida e mordida direcionada para a região dorso-caudal do animal (Figura 24A). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento dos animais com o antagonista do TRPA1, AP-18 (70 mg/kg i.p., 30 minutos antes,), inibiu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo cinamaldeído (3,97 nmol/sítio). Por outro lado, a resposta nociceptiva induzida pela administração i.t. de cinamaldeído foi drasticamente reduzida nos animais TRPA1<sup>-/-</sup> (TRPA1 KO) (Figura 24 B).



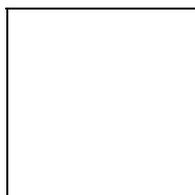
**Figura 24.** Efeito nociceptivo induzido por diferentes doses de cinamaldeído injetado intratecalmente em animais selvagens (A). O efeito do cinamaldeído (3,97 nmol/sítio) foi revertido pelo pré-tratamento feito 30 minutos antes com o antagonista AP-18 (70 mg/kg, i.p.) e em animais TRPA1<sup>-/-</sup> (TRPA1 KO) (B). Os eixos verticais representam as respostas nociceptivas observadas em segundos. Cada coluna representa a média de oito a doze animais  $\pm$  E.P.M. \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001, denotam níveis de significância quando comparados com os animais que foram tratados com veículo (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

A Figura 25 demonstra que o (-)-linalol (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir de forma significativa e dependente da

dose, a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído (3,97 nmol/sítio), com valor de  $DI_{50}$  de 114,4 (64,8 – 172,3) mg/kg e inibição de  $79 \pm 5\%$ . Entretanto, o mesmo tratamento não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela administração intratecal de capsaicina. Além disso, a análise feita por Western blotting mostrou que a administração de cinamaldeído não foi capaz de aumentar a fosforilação da JNK na medula (Figura 26).



**Figura 25.** Efeito do (-)-linalol administrado oralmente (50 – 200 mg/kg, 60 min antes) contra a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído (A, 3,97 nmol/sítio) ou capsaicina (B, 100 pmol/sítio) em camundongos. Os eixos verticais representam as respostas nociceptivas observadas em segundos para os diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de seis animais  $\pm$  E.P.M. Valores do controle (C) indicam os animais tratados com veículo (10 ml/kg v.o.) e os asteriscos denotam níveis de significância \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , quando comparados com os valores dos grupos controles (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).



**Figura 26.** Efeito da administração intratecal de cinamaldeído (3,97 nmol/sítio) e de (-)-linalol na fosforilação da JNK na medula espinhal de camundongos. Cada barra representa a média de 6 animais  $\pm$  E.P.M. Os dados são expressos como a razão entre as formas fosforiladas e total da p38MAPK. Análises estatísticas foram feitas por ANOVA de uma via, seguida por teste de Newman-Keuls.

#### **4.6.1 Envolvimento da proteína quinase C (PKC) na ação antinociceptiva do (-)-linalol: teste do miristato-acetato de forbol (PMA)**

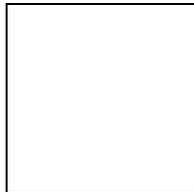
Para avaliar o envolvimento da PKC na ação antinociceptiva do (-)-linalol, os animais receberam uma injeção i.pl. de PMA (50 pmol/pata), um ativador direto da proteína quinase C (PKC) e, foi observado o tempo de lambida e mordida da pata injetada, indicativo de nocicepção. Os resultados apresentados na figura 27 mostram que a administração sistêmica de (-)-linalol (25 – 100 mg/kg v.o.) causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção, induzida pelo PMA. O valor encontrado para  $DI_{50}$  foi de 36,1 (23,0 – 56,6) mg/kg e inibição de  $84 \pm 6\%$ .



**Figura 27.** Efeito da administração oral de (-)-linalol (25 – 100 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA (50 pmol/pata) em camundongos. O eixo vertical representa a resposta nociceptiva observada em segundos para os diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de seis a dez animais  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos denotam níveis de significância \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparados com os valores dos grupos controles (C, tratados com veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### **4.7 Avaliação do envolvimento do TRPA1 na nocicepção induzida pelo glutamato**

Com base nos resultados apresentados anteriormente em que o (-)-linalol inibe a nocicepção induzida pelo glutamato, através da inibição de receptores ionotrópicos, e também, a nocicepção induzida por cinamaldeído, tornou-se importante fazer uma análise do envolvimento dos canais TRPA1 na nocicepção induzida pelo glutamato. A Figura 28 mostra que a administração intraplantar de glutamato (20  $\mu$ mol/pata) causou resposta nociceptiva em animais com deleção gênica para o receptor TRPA1<sup>-/-</sup> (TRPA1 KO), de maneira equivalente à nocicepção observada em camundongos selvagens (WT) e em animais C57/Bl6J puros. Além disso, pode-se observar na Figura 28 que o (-)-linalol (10 – 100 mg/kg v.o.) foi capaz de reduzir de maneira significativa, porém não dependente da dose, a nocicepção induzida pelo glutamato nos animais TRPA1<sup>-/-</sup>, com inibição de  $84 \pm 11\%$ .



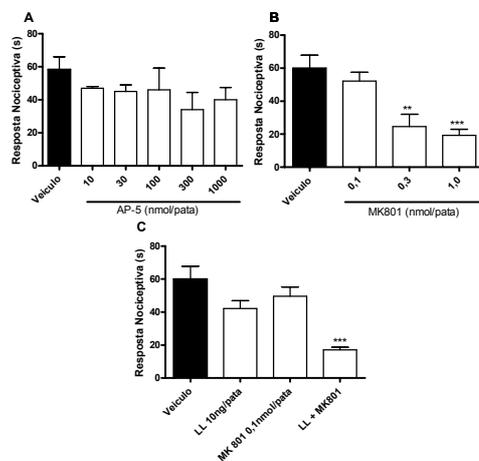
**Figura 28.** Efeito da administração de (-)-linalol (10 – 100 mg/kg, v.o. 60 min antes) ou veículo (10 ml/kg v.o., 60 min antes) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20  $\mu$ mol/pata) em animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 (TRPA1 KO). O eixo vertical representa a resposta nociceptiva (segundos) para os camundongos C57/B16J, selvagens (WT) e TRPA1<sup>-/-</sup> submetidos aos diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de sete animais  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos denotam níveis de significância \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, quando comparados com os valores dos grupos controles (animais TRPA1 KO tratados com veículo) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### **4.8 Avaliação do envolvimento dos receptores NMDA na nocicepção induzida pelo cinamaldeído**

Para avaliar uma possível participação dos receptores glutamatérgicos, mais especificamente dos receptores NMDA, na nocicepção induzida por cinamaldeído, os animais foram co-injetados com antagonistas de receptores NMDA (MK801 e AP-5) e cinamaldeído (10 nmol/pata). Assim, pode-se observar na Figura 29 que a co-injeção do antagonista competitivo de receptores NMDA, AP-5 (10 – 1000 nmol/pata) com cinamaldeído, não foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Porém, a co-injeção do antagonista não-competitivo de receptores NMDA, MK801 (0,1 – 1,0 nmol/pata) com cinamaldeído, inibiu de maneira significativa e dependente da dose, a nocicepção induzida pelo cinamaldeído (10 nmol/pata), com  $DI_{50}$  de 0,33 (0,28 – 0,41) ng/pata e inibição de  $68 \pm 6\%$  (Figura 29 A e B).

O próximo passo foi, então, examinar um possível efeito sinérgico entre o MK801 com o (-)-linalol na nocicepção induzida

pelo cinamaldeído. Para isto, foi realizada a co-administração de dose subefetiva de (-)-linalol (10 ng/pata) juntamente com uma dose sub-efetiva de MK801 (0,1 nmol/pata) e o efeito deste tratamento foi analisado na nocicepção induzida pelo cinamaldeído (10 nmol/pata). A Figura 29C mostra que o MK801 (0,1 nmol/pata) co-injetado com (-)-linalol (10 ng/pata), 5 minutos antes da administração de cinamaldeído (10 nmol/pata), promoveu uma redução significativa da nocicepção causada pelo cinamaldeído, sendo que o MK801 e (-)-linalol isoladamente, não apresentaram o mesmo efeito, sugerindo, portanto, um importante efeito sinérgico entre o MK801 e (-)-linalol.



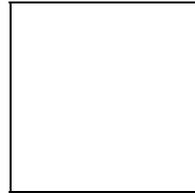
**Figura 29.** Efeito da administração intraplantar de AP-5 (10 – 1000 nmol/pata) (A), MK801 (0,1 – 1 ng/pata) (B) ou da co-administração de (-)-linalol (10 ng/pata) e MK801 (0,1 nmol/pata) (C) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (10 nmol/pata). Os eixos verticais representam a

resposta nociceptiva (segundos) para dos diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de seis a dez animais  $\pm$  E.P.M. Os asteriscos denotam níveis de significância  $**P<0,01$  e  $***P<0,001$ , quando comparados com os valores dos grupos controles (animais tratados com veículo) (ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.9 Análise da participação dos receptores de potencial transitório (TRPs): estudos *in vitro*

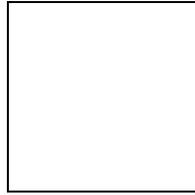
Para aprofundar o entendimento do efeito do (-)-linalol sobre receptores TRPs, foi utilizada a técnica de medidas da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{+2}]_i$ ) em cultura de células CHO transfectadas com TRPA1 ou TRPV1 e, também, cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos.

A Figura 30 mostra que a adição de (-)-linalol (50 – 500  $\mu$ M) ao meio inibiu, de maneira significativa e dependente da concentração, o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo alil isotiocinato (AITC, agonista TRPA1) em células CHO transfectadas com TRPA1. Entretanto, apenas a maior concentração utilizada de (-)-linalol (500  $\mu$ M) foi capaz de inibir o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo capsaicina (agonista TRPV1) em células CHO transfectadas com TRPV1 (Figura 31).



**Figura 30.** Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol (50, 100, 250 e 500  $\mu$ M) e veículo em cultura de células CHO transfectadas com TRPA1 ativadas com alilisotiocinato, AITC (50  $\mu$ M) (n = 196) (A). Representação gráfica do efeito do (-)-linalol (LL 50, 100, 250 e 500  $\mu$ M) e veículo no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de células CHO

transfectadas com TRPA1, ativadas com AITC (50  $\mu\text{M}$ ). Cada linha horizontal mostra a  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  obtida através do tempo para as diferentes substâncias utilizadas e a linha vertical são as razões de fluorescência de células marcadas com FURA-2 (B).



**Figura 31.** Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol (50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ) e veículo no aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  em cultura de células CHO transfectadas com TRPV1 ativadas com capsaicina (1  $\mu\text{M}$ ) (n = 314) (A). Representação gráfica do efeito do (-)-linalol (LL, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ) e veículo no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de células CHO transfectadas com TRPV1 ativadas com capsaicina (1  $\mu\text{M}$ ). Cada linha horizontal mostra a  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  obtida através do tempo para as diferentes substâncias utilizadas e a linha vertical são as razões de fluorescência de células marcadas com FURA-2 (B).

A partir destes resultados, tornou-se necessário avaliar o efeito do (-)-linalol em um sistema de maior complexidade. Sendo assim, foi avaliado o efeito da adição de (-)-linalol (500  $\mu\text{M}$ ) em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos. A tabela 1 mostra o número de neurônios do GRD de camundongos responsivos ou não aos agonistas TRPs: capsaicina (agonista TRPV1, 1 $\mu\text{M}$ ), alil isotiocianato (agonista TRPA1, AITC, 100 $\mu\text{M}$ ) ou mentol (agonista TRPM8, 100 $\mu\text{M}$ ). A presença de 500  $\mu\text{M}$  de (-)-linalol foi capaz de ativar neurônios sensíveis aos agonistas TRPs e também neurônios não-responsivos aos agonistas TRPs. Porém, a quantidade de neurônios sensíveis ao (-)-linalol foi de apenas 4,3%. Destes, 17,4% responderam à capsaicina, 39,1% responderam à capsaicina e ao AITC, 17,4%

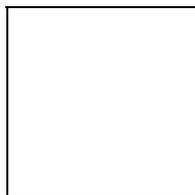
responderam ao mentol e 26,1% não responderam aos agonistas TRPs.

**Tabela 1. Responsividade de neurônios do gânglio da raiz dorsal estimulados com (-)-linalol e agonistas TRPs**

	LL-sensíveis	LL-insensíveis	Total Neurônios
	23 (4,3%)	507 (95,7%)	530
CAP sensíveis	4	154	158 (29,8%)
AITC/CAP sensíveis	9	86	95 (17,9%)
Mentol sensíveis	4	21	25 (4,7%)
Não-responsivos aos agonistas TRPs	6	246	252 (47,5%)

Populações neuronais dos gânglios da raiz dorsal sensíveis ao (-)-linalol (500  $\mu$ M), capsaicina (CAP, 1  $\mu$ M), alil isotiocianato (AITC, 100 $\mu$ M) ou mentol (100  $\mu$ M).

A Figura 32 mostra que em cultura de neurônios do GRD de camundongos, o (-)-linalol (50,100 e 250  $\mu$ M), MK801 (100  $\mu$ M) e veículo não causaram um aumento na  $[Ca^{+2}]_i$ . Por outro lado, o (-)-linalol, nas concentrações de 100 e 250  $\mu$ M, e não de 50  $\mu$ M, foi capaz de reduzir o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzida pelo alil isotiocianato (AITC, 100  $\mu$ M). Além disso, pode-se observar também que o MK801 (100  $\mu$ M) não foi capaz de reduzir o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzida pelo alil isotiocianato.

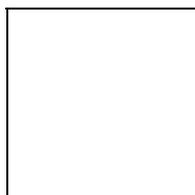


**Figura 32.** Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol (50, 100 e 250  $\mu$ M), veículo ou MK801 (100  $\mu$ M) no

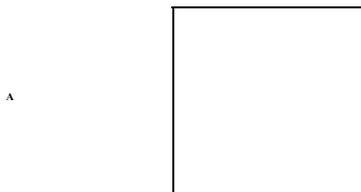
aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos ativadas com alil isotiocianato, AITC (100  $\mu$ M) (n = 248) (A). Representação gráfica do efeito do (-)-linalol (LL, 50, 100 e 250  $\mu$ M), MK801 (100  $\mu$ M) e veículo no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos (DRG), ativadas com AITC (100  $\mu$ M). Cada linha horizontal mostra a  $[Ca^{+2}]_i$  obtida através do tempo para as diferentes substâncias utilizadas e a linha vertical são as razões de fluorescência de células marcadas com FURA-2. Como controle do experimento, as células foram ativadas com KCl 50mM no final de cada ensaio.

#### **4.10 Envolvimento do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva do (-)-linalol: estudos *in vitro***

Para compreender melhor o efeito do (-)-linalol a nível medular, cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos com a idade de 5 – 7 dias foram ativados com glutamato (100  $\mu$ M + 10  $\mu$ M de glicina). Assim, a Figura 33 demonstra que a ativação de neurônios do corno dorsal da medula espinhal pelo glutamato se dá, provavelmente, pela ativação direta de todos os tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, pois não foi utilizado nenhum agonista específico para os receptores glutamatérgicos neste experimento; além disso, o meio utilizado foi livre de  $Mg^{2+}$ . No entanto, pode-se observar também na Figura 34 que o (-)-linalol na concentração de 500  $\mu$ M, mas não na concentração de 100  $\mu$ M, foi capaz de reduzir o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzida pelo glutamato.



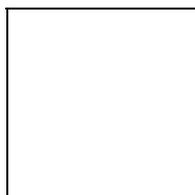
**Figura 33.** Representação gráfica do efeito do glutamato (100  $\mu\text{M}$ ) no aumento da concentração de cálcio intracelular em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Cada linha horizontal mostra a  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  de cada neurônio obtidas através do tempo e a linha vertical são as razões de fluorescência de células marcadas com FURA-2.



**Figura 34.** Razões de fluorescências obtidas na presença de (-)-linalol (100 e 500  $\mu\text{M}$ ) ou veículo no aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal ativadas com glutamato (100  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 359$ ) (A). Em B, representação gráfica do efeito do (-)-linalol e do veículo na  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ . Cada linha horizontal mostra a  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  obtida através do tempo para as diferentes substâncias utilizadas e a linha vertical são as razões de fluorescência de células marcadas com FURA-2. Como controle do experimento, as células foram ativadas com KCl 50mM no final de cada ensaio.

#### **4.11 Atividade antinociceptiva do (-)-linalol em modelos de nociceção inflamatória persistente e neuropática.**

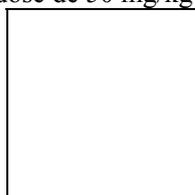
Muitos processos inflamatórios crônicos e neuropatias são desordens clínicas, as quais afetam pacientes promovendo estados de dor crônica, permanecem sem uma terapia realmente eficiente. Para avaliar o efeito do (-)-linalol na nociceção inflamatória persistente, foi utilizado um modelo que consiste de uma reação imunológica através da injeção intraplantar de CFA na pata traseira direita. A injeção intraplantar de CFA nos camundongos induziu uma profunda hipersensibilidade mecânica e térmica (frio), bem como um aumento no volume da pata. Os animais tratados intraperitonealmente com (-)-linalol (50 e 200 mg/kg) 30 minutos antes do teste, exibiram uma redução da hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA. Este efeito iniciou 30 minutos após a administração de (-)-linalol e foi mantido por 10 horas (Figura 35A). O efeito mais pronunciado foi observado 30 minutos após sua administração, quando o (-)-linalol (200 mg/kg, i.p.) inibiu  $92 \pm 8\%$  da hipernociceção mecânica induzida pelo CFA. O tratamento prolongado com a administração diária de (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.), duas vezes ao dia, por 5 dias consecutivos, reduziu significativamente a hipernociceção mecânica induzida pelo CFA, com inibição máxima de  $71 \pm 6\%$  no terceiro dia (Figura 35B). Quando o tratamento foi interrompido por três dias, a hipernociceção mecânica foi restabelecida. No nono dia, o tratamento foi reiniciado e foi observado que (-)-linalol mais uma vez foi capaz de reduzir a hipernociceção mecânica, excluindo a possibilidade do desenvolvimento de tolerância (Figura 35 B).



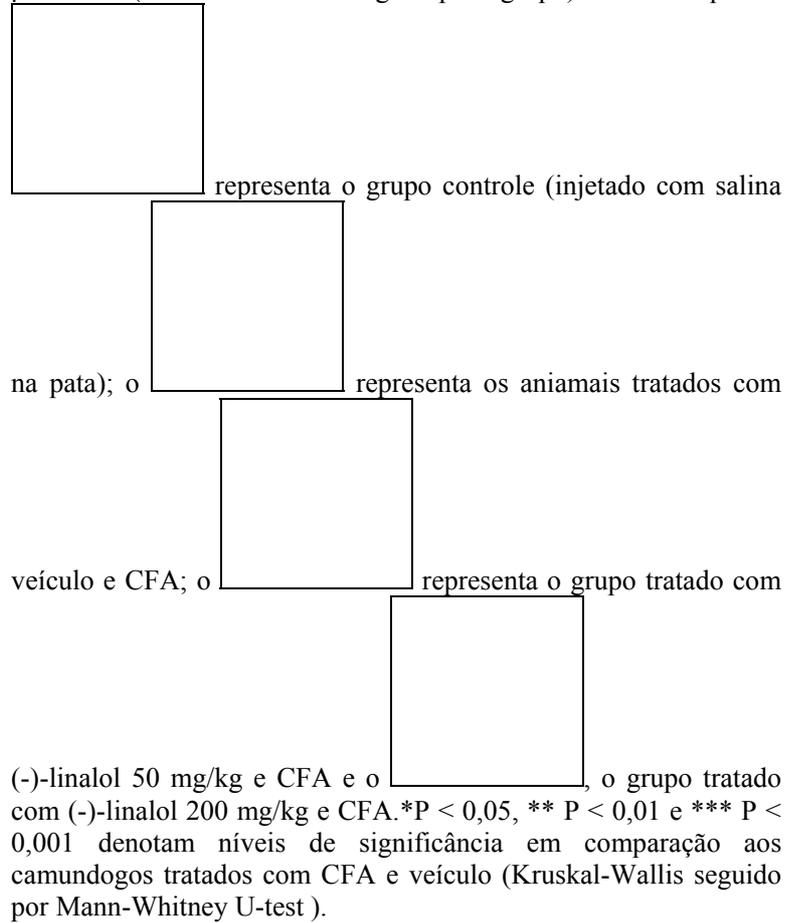
**Figura 35.** Efeitos da administração aguda (A) e crônica (B) de (-)-linalol (50 e 200 mg/kg i.p.) na hipersensibilidade mecânica em camundongos 24 horas após a injeção de CFA. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 50% do limiar de retirada da pata (em gramas) para o estímulo tátil da pata traseira ipsilateral antes da injeção de CFA (por exemplo basal, B) ou em diferentes períodos (n = 6 – 10 camundongos por grupo). \*p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 denotam níveis de significância em comparação aos camundongos tratados com CFA (Kruskal-Wallis seguindo por Mann-Whitney U-test).

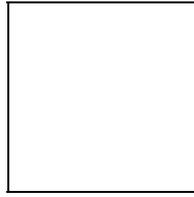
Os resultados apresentados na figura 36 mostram que a administração de (-)-linalol (50 e 200 mg/kg i.p.) reduziu a hipersensibilidade ao frio, induzida pela injeção intraplantar de CFA. As inibições máximas foram observadas de 30 minutos até 4 horas após a administração de (-)-linalol, sendo a inibição máxima de  $97 \pm 2\%$ , na segunda hora para as duas doses testadas.

A injeção de CFA causou um aumento no volume da pata 24 horas, após sua administração. Este efeito foi significativamente revertido 4 horas após a administração intraperitoneal de (-)-linalol, com reduções do volume da pata de  $66 \pm 11\%$  para a dose de 200 mg/kg e  $43 \pm 9\%$  para a dose de 50 mg/kg (Figura 37).

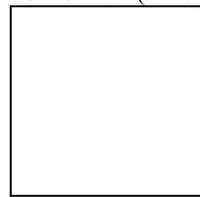


**Figura 36.** Decurso temporal do efeito da administração aguda de (-)-linalol (50 e 200 mg/kg, i.p.) na hipersensibilidade ao estímulo não – nocivo frio (acetona) em camundongos, 24 horas após a injeção de CFA. Cada ponto representa a média ± E.P.M. das respostas nociceptivas (em segundos) evocados pela aplicação de 20 µl de acetona na pata ipsilateral (basal, B) ou em diferentes períodos (n = 8 camundongos por grupo). Sendo que o



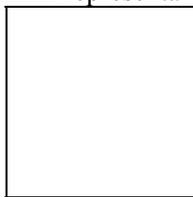


**Figura 37.** Decurso temporal do efeito da administração aguda de (-)-linalol (50 e 200 mg/kg, i.p.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de CFA em camundongos. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. do volume da pata (em  $\mu$ L) antes da injeção de CFA (basal, B) ou ao longo do tempo 24 após a injeção de CFA (n de 8 camundongos por grupo). Sendo que o



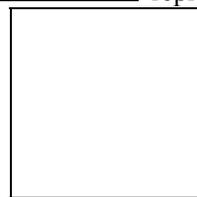
representa o grupo controle (injetado com salina

na pata); o



representa os animais tratados com

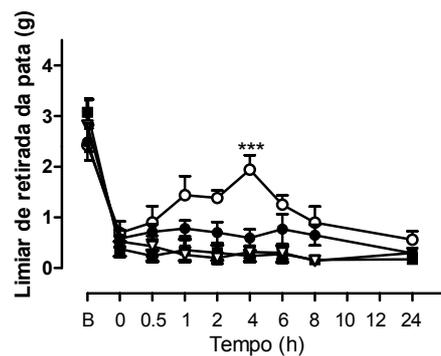
veículo e CFA; o



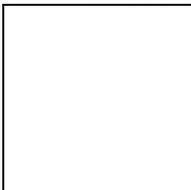
representa o grupo tratado com

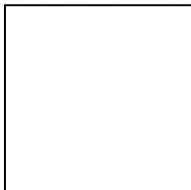
(-)-linalol 50 mg/kg e CFA e o , o grupo tratado com (-)-linalol 200 mg/kg e CFA. \*\* P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 denotam níveis de significância em comparação aos camundongos tratados com CFA e veículo(Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney U-test).

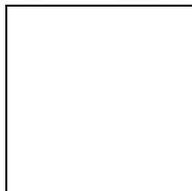
Para avaliar a participação dos receptores TRPA1 na ação antinociceptiva do (-)-linalol em modelo de dor inflamatória crônica, foram utilizados animais com deleção gênica para os receptores TRPA1 (TRPA1<sup>-/-</sup> ou TRPA1 KO). A injeção i.pl. de CFA (20 µL) induziu hipersensibilidade aos monofilamentos de Von Frey 24 horas após a injeção em animais geneticamente modificados e animais selvagens. O tratamento agudo feito com o (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.) em camundongos TRPA1<sup>-/-</sup> não foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica induzida pelo CFA. Em animais selvagens (WT), a injeção intraplantar de CFA aumentou a sensibilidade mecânica aos monofilamentos de Von Frey, a qual foi reduzida pela administração de (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.), sendo que a inibição ocorreu na quarta hora após o tratamento (Figura 38).

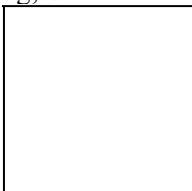


**Figura 38.** Decurso temporal do efeito da administração aguda de (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.) na hipersensibilidade ao estímulo mecânico em camundongos selvagens (WT) ou com deleção gênica para o receptor TRPA1 (TRPA1 KO) 24 horas após a injeção de CFA. Cada ponto representa a média ± E.P.M. de 50% do limiar de retirada da pata (em gramas) para o estímulo tátil da pata traseira ipsilateral antes da injeção de CFA (por exemplo basal, B) ou nos tempos subsequentes indicados de seis a nove camundongos por

grupo. Sendo que o  representa os animais

selvagens tratados com veículo (controle);  representam os animais selvagens tratados com (-)-linalol 50

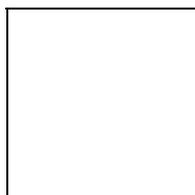
mg/kg; o  representa o grupo TRPA1 KO controle

e o  o grupo de animais TRPA1 KO tratado com (-)-linalol 50 mg/kg. \*\*\* P < 0,001 denota nível de significância em

comparação aos camundogos tratados com veículo (controle) (Kruskal-Wallis teste seguindo por Mann-Whitney U-test).

Foi investigado, também, o efeito do (-)-linalol no modelo de neuropatia induzido pela ligação parcial do nervo ciático. Como ilustrado na figura 39, a ligação parcial do nervo ciático causou um acentuado desenvolvimento da hipernocicepção mecânica na pata traseira ipsilateral, 7 dias após o procedimento. O tratamento agudo com (-)-linalol (50 e 200 mg/kg, i.p.) significativamente reduziu as respostas de retirada da pata ( $73 \pm 17\%$  e  $59 \pm 11\%$ , respectivamente), sendo este efeito mantido por 6 horas após o tratamento com a dose de 50 mg/kg (Figura 39 A).

O tratamento diário com (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.), duas vezes ao dia, por 5 dias consecutivos, diminuiu significativamente a hipersensibilidade mecânica nos camundongos neuropáticos (Figura 39 B). Após a suspensão do tratamento, o efeito anti-hipernociceptivo do (-)-linalol não foi observado. Quando o tratamento foi restabelecido no nono dia, a administração de (-)-linalol produziu o mesmo efeito anti-hipernociceptivo ( $94 \pm 6\%$  de inibição, (-)-linalol 50 mg/kg i.p.), mostrando que (-)-linalol não induziu tolerância neste modelo (Figura 39 B). Além disso, a administração de (-)-linalol (50 mg/kg, i.p.) diminuiu o tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada, no teste da placa fria (Figura 40 A); porém, não alterou a latência de retirada da pata (Figura 40 B).



**Figura 39.** Efeitos da administração aguda (A) e crônica (B) de (-)-linalol (50 e 200 mg/kg, i.p.) na hipernocicepção mecânica em camundongos, sete dias após a ligação parcial do nervo ciático. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 50% do limiar de retirada da pata (em gramas) para o estímulo tátil da pata traseira ipsilateral, antes da injeção de CFA (por exemplo basal, B) ou em diferentes períodos (n de 6 – 10 camundongos por grupo). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , denotam níveis de significância em comparação aos camundongos tratados com veículo (LPNC) (Kruskal-Wallis seguido por Mann-Whitney U-teste).



**Figura 40.** Efeito da administração intraperitoneal de (-)-linalol (50 mg/kg i.p.) no tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada (A) e na latência de retirada da pata (B), induzidos por estímulo frio  $5.0 \pm 2^\circ\text{C}$  em camundongos, 7 dias após a ligação parcial do nervo ciático. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo e as linhas verticais, o tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada ou o tempo de latência da retirada da pata sobre a placa fria. \*\* $p < 0,01$  denota o nível de significância em relação ao grupo tratado com veículo (controle) (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Newmann – Keuls).



## 5. Discussão

Ao longo dos tempos, os produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, vêm se constituído numa importante fonte de agentes terapêuticos. É digno de nota que a medicina tradicional chinesa utiliza-se de muitas espécies de plantas aromáticas para aliviar sintomas e curar doenças tanto agudas quanto crônicas. Neste sentido, trabalhos descritos na literatura sugerem que o (-)-linalol, um monoterpene encontrado em plantas aromáticas, com estrutura química relacionada ao mentol, possui propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias (Peana et al., 2002 e 2003). Além disso, estes estudos demonstram que o (-)-linalol produz antinocicepção através do envolvimento de diferentes receptores e sistemas, assim, têm sido sugeridos que os receptores opióides, dopaminérgico D2, adenosinérgicos A1 e A2A, sistema glutamatérgico e receptores muscarínicos estão envolvidos no efeito antinociceptivo do (-)-linalol (Peana et al., 2003, 2004 e 2006).

Interessantemente, extratos de plantas que contêm 75% de (-)-linalol são relatados causarem sensações de acidez e ardência na cavidade oral (Riera et al. 2009), podendo este efeito ser atribuído à estimulação de receptores TRPs. Neste sentido, foi demonstrado que o (-)-linalol atua como um agonista fraco de receptores TRPM8 (Behrendt et al., 2004), bem como estimula receptores TRPA1 (Riera et al., 2009).

Com respeito ao sistema glutamatérgico foi demonstrado que o (-)-linalol inibe de maneira competitiva, a ligação específica (binding) de L-[<sup>3</sup>H]-glutamato e produz inibição, dependente da concentração, do binding de [<sup>3</sup>H]-MK801 em membranas de córtex de camundongos (Elisabetsky et al., 1995).

Assim, neste estudo procurou-se, de uma maneira geral, através de experimentos comportamentais, bioquímicos e celulares, confirmar e estender os dados

descritos na literatura, que demonstram que o (-)-linalol possui ação antinociceptiva. Além disso, foi analisada a participação do sistema glutamatérgico e dos receptores TRPA1 no mecanismo de ação antinociceptivo deste composto, como mostrado na figura 41.

No presente estudo, inicialmente, foi verificado através de uma avaliação comportamental se existia diferença na resposta nociceptiva entre duas linhagens distintas de camundongos: C57/B16 e Swiss. Os nossos dados mostraram que não existe diferença na resposta nociceptiva, caracterizada pelo comportamento de lambida e mordida da pata injetada com os agentes algogênicos, glutamato e cinamaldeído, entre as duas linhagens estudadas. Portanto, estes resultados permitem sugerir que, apesar de existir diferença genética entre as duas linhagens de animais utilizados, as respostas nociceptivas avaliadas neles parecem ser semelhantes.

Estudos realizados tanto em humanos (Nordlind et al., 1993, Warneche et al., 1997, Gazerani et al., 2006) quanto em animais de laboratório (Davidson et al., 1997, Cairns et al., 1998, Davidson e Carlton, 1998) têm demonstrado que aminoácidos excitatórios, em especial o glutamato, contribuem para o desenvolvimento e/ou manutenção da dor. Além disso, está bem estabelecido que o glutamato participa da transmissão dos sinais nociceptivos do sistema nervoso periférico para o corno dorsal da medula espinhal. De fato, Carlton e colaboradores (1995) demonstraram que a injeção intraplantar de L-glutamato induz hiperalgesia em ratos e adicionalmente, a injeção i.pl. de agonistas específicos de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (DHPG) glutamatérgicos, promovem aumento na sensibilidade mecânica e térmica, passível de ser bloqueada pelos seus respectivos antagonistas (Bhave et al., 2001, Zhou et al., 2001). Além disso, outros estudos têm demonstrado que receptores de aminoácidos excitatórios, como o NMDA, estão envolvidos na transmissão nociceptiva, auxiliando tanto no desenvolvimento quanto na manutenção do estado doloroso (Ferreira et al., 1999; Larsson, 2009). Neste sentido, está bem estabelecido que substâncias capazes de bloquear receptores glutamatérgicos

apresentam efeitos analgésicos e antinociceptivos em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos (Chizh, 2002; Lufty et al., 1997, Neugebauer, 2002; Santos et al., 2005, Wiech et al., 2004).

Assim, estudos utilizando-se de antagonistas de receptores NMDA realizados em humanos, como a quetamina, memantina, amantadina e dextrometorfano, mostraram que estas substâncias podem produzir efeitos analgésicos, reduzindo a dor crônica de origem neuropática (Block e Habermeyer, 2003). Entretanto, o uso de antagonistas NMDA é problemático devido aos efeitos colaterais centrais induzidos por estes (Chizh, 2002, Millan, 1999). Por esta razão, o estudo de novas drogas que bloqueiam o sistema glutamatérgico, em especial os receptores NMDA, com efeitos colaterais reduzidos, torna-se necessário.

Neste sentido, existem descritos na literatura vários modelos animais de nocicepção que abordam o envolvimento do sistema glutamatérgico (Carlton et al., 1995; Bhave et al., 2001; Davidson et al., 1997) e que prestam para o estudo de novas substâncias com potencial efeito analgésico (antinociceptivo). Assim, destaca-se o estudo realizado por Beirith e colaboradores (2002), que demonstrou que a injeção intraplantar de glutamato é capaz de induzir uma resposta nociceptiva em camundongos. Além disso, os autores demonstraram que a nocicepção causada pelo glutamato parece envolver sítios de ação periférica, espinhal e supraespinhal, sendo amplamente mediada tanto por receptores NMDA quanto não-NMDA.

Os resultados apresentados neste estudo claramente demonstram que o (-)-linalol produziu inibição significativa da resposta nociceptiva causada pelo glutamato injetado via intraplantar, na pata posterior direita de camundongos. É importante salientar que a nocicepção causada pelo glutamato foi inibida pela administração sistêmica (via oral e intraperitoneal), central (via intratecal) e periférica (intraplantar) de (-)-linalol. Outro aspecto importante observado no presente estudo foi que o (-)-linalol foi quatro vezes mais potente em inibir a nocicepção induzida pelo glutamato quando administrado pela via oral, se comparado com a via intraperitoneal. Este aspecto é interessante, tendo em vista, que

a maioria dos medicamentos clinicamente úteis no controle da dor são utilizados pela via oral. No entanto, até o presente momento, não se tem uma explicação para este potente efeito do linalol administrado pela via oral, porém, sugere-se que este efeito seja por fatores farmacocinéticos, pois, dados da literatura mostram que o (-)-linalol administrado oralmente sofre processos de biotransformação produzindo metabólitos tais como 8-hidroxi-linalol e 8-carboxi-linalol (Chadha e Madyastha, 1984). Entretanto, estudos adicionais utilizando estes metabólitos são necessários para confirmar se os mesmos produzem efeito antinociceptivo *per se* ou se são aditivos ao apresentado pelo (-)-linalol.

Como descrito anteriormente, o glutamato produz nocicepção por atuar em receptores distintos, sendo estes divididos em duas classes principais; os receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos permeáveis a cátions e, são subdivididos em três grupos: NMDA, AMPA e cainato (Nakanishi et al., 1992; Ozawa et al., 1998). Já, os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína de ligação ao GTP, conhecida como proteína G e modulam a ativação de segundos mensageiros, principalmente o 1,4,5 fosfato inositol (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG), ou alteram a atividade de canais iônicos (Hudspith, 1997; Osawa et al., 1998).

Neste estudo, procurou-se também analisar através de uma abordagem farmacológica, qual dos subtipos de receptores glutamatérgicos que estaria envolvido no efeito antinociceptivo do (-)-linalol. Para isto, os animais foram pré-tratados com o (-)-linalol (200 mg/kg, i.p.), seguido por uma injeção intratecal de diferentes agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópico (*trans*-ACPD). Assim, pode-se observar que o (-)-linalol foi capaz de reduzir significativamente as respostas nociceptivas induzidas pela administração intratecal dos agonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, sendo mais eficaz contra a resposta causada pelo NMDA; porém, não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal do agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos, o *trans*-ACPD. Neste sentido, a falta de efeito do (-)-linalol contra a injeção intratecal do agonista de receptores metabotrópicos

glutamatérgicos, *trans*-ACPD, na dose que reduz substancialmente o comportamento nociceptivo causado por agonistas ionotrópicos, parece excluir a possível contribuição do mecanismo operado pelo mGluRs na sua resposta antinociceptiva. Portanto, sugere-se que o (-)-linalol possui uma ação antinociceptiva por agir em receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópico (Figura 41). Além disso, é importante mencionar que dados descritos na literatura mostram que o (-)-linalol (200 mg/kg), administrado pela via subcutânea, foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar de glutamato em ratos (Peana et al., 2004). Assim, estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo e confirmam um envolvimento do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva do linalol.

É importante mencionar que Elisabestky e colaboradores, em 1995, demonstraram que o (-)-linalol reduziu o *binding* do L-[<sup>3</sup>H]-glutamate, de maneira competitiva, em seus sítios de ligação, bem como, apresentou redução de maneira não-competitiva do *binding* do [<sup>3</sup>H]-MK801 em membranas de córtex de camundongos. Além disso, o (-)-linalol foi eficaz em reduzir *in vivo* as convulsões induzidas pelo NMDA e ácido quinolinico em camundongos (Silva Brum et al., 2001a,b).

Dados da literatura mostram que compostos que exercem um efeito sobre receptores glutamatérgicos produzem significativos distúrbios na atividade locomotora (Parsons, 2001; Pietraszek et al., 2007; Takahashi e Afford, 2002). Neste sentido, Coderre e Van Empel (1994) demonstraram que o antagonista de receptores NMDA, MK801, produz efeitos indesejáveis como distúrbios de coordenação motora. Assim, ao contrário do observado para o MK801, o (-)-linalol, mesmo quando administrado em altas doses, produziu antinocicepção de forma significativa sem alterar a atividade motora do animal avaliada no Rota-Rod, excluindo a influência de um possível efeito inespecífico como sedação ou disfunção motora, na ação antinociceptiva do linalol.

Neste trabalho, procurou-se também confirmar a interação do linalol com o sistema glutamatérgico, através de ensaios *in vitro*, utilizando culturas primárias de neurônios do corno dorsal da medula espinhal de camundongos. De fato, dados da literatura

demonstram que fibras aferentes primárias que convertem as informações sensoriais, incluindo as nociceptivas, de órgãos periféricos para o corno dorsal da medula espinhal, usam glutamato como o transmissor primário (Todd et al., 2003; Broman, 1994). Além disso, a maioria dos interneurônios excitatórios dentro do corno dorsal são glutamatérgicos (Todd et al., 2003). Portanto, neste trabalho foi observado que realmente o glutamato é capaz de induzir um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em neurônios do corno dorsal da medula espinhal, sendo este aumento inibido pela presença de 500  $\mu$ M de (-)-linalol. Sugere-se que a administração de glutamato em cultura de neurônios do corno dorsal da medula espinhal cause uma ativação de receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos como metabotrópicos; portanto, através destes dados, não podemos dizer qual receptor glutamatérgico específico o (-)-linalol estaria interagindo, apenas que o (-)-linalol bloqueia a resposta induzida pelo glutamato. Porém, dados obtidos no presente estudo, em conjunto com os dados da literatura, mostraram que o (-)-linalol interage com os receptores glutamatérgicos ionotrópicos; portanto, sugere-se que a inibição causada pelo (-)-linalol no aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelo glutamato em cultura de células neuronais se deve à sua interação com os receptores glutamatérgicos ionotrópicos.

Vários estudos demonstram que a substância P desencadeia liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal através de sua interação com os receptores para neurocinina 1 (NK1). Desta forma, a SP transmite o sinal nociceptivo para áreas supraespinhais do sistema nervoso central (Battaglia e Rustoni, 1988; Millan, 1999, Lima-Júnior et al., 2007). Neste sentido, Mjellem-Joly e colaboradores (1992) demonstraram que o comportamento indicativo de dor, o qual pode ser observado após a administração espinhal de substância P, é potencializada pela co-administração de NMDA. Foi demonstrado também que os receptores NMDA, localizados nos terminais pré-sinápticos de fibras sensoriais de pequeno diâmetro, facilitam e prolongam a transmissão da mensagem nociceptiva através da liberação de substância P e glutamato (Liu et al., 1997). Portanto, uma importante ligação entre glutamato e substância P na transmissão nociceptiva tem sido bem

documentada na literatura (Afrah et al., 2000; Chizh, 2002; Liu et al., 1997; Marvizon et al., 1997; Rusin et al., 1993).

Visto que a SP possui uma interação com o sistema glutamatérgico, hipotetizou-se que a SP poderia estar envolvida no efeito antinociceptivo do (-)-linalol. Neste sentido, no presente estudo demonstramos que o (-)-linalol atenuou a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de SP. Corroborando com tais observações, pode-se especular que o (-)-linalol age em receptores NMDA reduzindo o comportamento nociceptivo produzido pela SP.

Dados da literatura demonstram que a injeção intratecal de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  diretamente sensibilizam neurônios na medula espinhal, promovendo um comportamento nociceptivo imediato (mordida e lambida dirigidos a porção caudal e sacudida das patas posteriores) (Robertson et al., 1997; Tadano et al., 1999). De fato, Tadano e colaboradores (1999), demonstraram que a ativação direta dos receptores glutamatérgicos e de neurocininas induzem a liberação de glutamato e de substância P dos terminais nervosos, podendo induzir um comportamento nociceptivo. Foi demonstrado também que a ativação de receptores NMDA modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$  em modelos de lesão nervosa periférica (Kleinschnitz et al., 2004). Portanto, no presente estudo foi demonstrado que a administração de (-)-linalol inibiu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Neste sentido, suger-se que o (-)-linalol previne a nocicepção induzida pelas citocinas pró-inflamatórias, através da inibição da ativação glutamatérgica de neurônios de projeção, via inibição de receptores NMDA.

Recentemente, foi descrito que a ativação do sistema glutamatérgico pode modular positivamente a função dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1). Por exemplo, receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico do gupo 1 participam do aumento da sensibilidade térmica, através da modulação do canal vanilóide (Hu et al., 2002). Além disso, os receptores NMDA periféricos modulam a atividade

eletromiográfica muscular da mandíbula induzida pela injeção de capsaicina na articulação temporomandibular de ratos (Lam et al., 2005). Foi demonstrado também que a aplicação de creme de capsaicina no dorso da pata de ratos induz aumento nos níveis de glutamato no espaço subcutâneo, sendo significativamente diminuído pelo tratamento feito com capsaicina, por 3 dias consecutivos (Jin et al., 2006). Em 2009, este mesmo autor demonstrou que a injeção subcutânea de capsaicina aumenta a liberação de glutamato no espaço subcutâneo, sendo inibida pela administração de capsazepina, antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (MK801, CNQX e NBQX) e metabotrópicos do grupo 1 (CPCCOEt e MPEP). Estes achados indicam que os receptores glutamatérgicos periféricos são responsáveis pelas respostas nociceptivas, via ativação do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1).

Com relação aos TRPA1, dados da literatura demonstram que agonistas seletivos para o receptor TRPA1, alil isotiocianato (AITC) e cinamaldeído, aumentam a transmissão sináptica excitatória, através do aumento da liberação de glutamato em terminais de fibras nervosas (Kosugi et al., 2007). Mais recentemente, Wrigley e colaboradores (2009) demonstraram que o AITC e o cinamaldeído modulam a transmissão glutamatérgica em subpopulações de neurônios das lâminas I e II<sub>0</sub> do corno dorsal da medula espinhal.

Neste sentido, Behrendt e colaboradores (2004) demonstraram que compostos quimicamente relacionados ao mentol, dentre eles o linalol (6,7 mM), produzem aumento  $[Ca^{+2}]_i$  em cultura de células HEK293 transfetadas com TRPM8. Atualmente, foi demonstrado que linalol (500  $\mu$ M) induz aumento na concentração de  $[Ca^{2+}]_i$  em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD), que responderam ambos a capsaicina (agonista de receptor TRPV1) e cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1) (Riera et al., 2009). Além disso, evidências encontradas na literatura indicam que vários membros da superfamília dos canais TRPs estão envolvidos na detecção dos estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos (para revisão veja Nilius et al., 2008). Neste sentido, no presente estudo foi analisado o possível efeito do (-)-

linalol nas respostas nociceptivas obtidas pela injeção intraplantar de cinamaldeído ou capsaicina.

Durante a década passada, várias pesquisas revelaram que membros da família de TRPs detectaram estímulos nocivos e transduziram estímulos químicos e físicos em potencial de ação nos nociceptores (Patapoutian e Woolf, 2009). Dentre estes canais, os canais TRPA1 foram identificados como receptores de frio nocivo ( $\sim 17^{\circ}\text{C}$ ) e descritos por estarem expressos nos gânglios da raiz dorsal, neurônios trigeminais e em uma subpopulação de nociceptores não-mielinizados, que também expressam o TRPV1 e contêm substância P e CGRP, sugerindo um importante papel na nocicepção (Story et al., 2003). Além disso, Kang e colaboradores (2010) sugeriram que o TRPA1 é um sensor antigo da percepção da dor em humanos, conservado da escala evolutiva de vertebrados e invertebrados, através de 500 milhões de anos.

O cinamaldeído é um composto químico pungente encontrado no óleo da canela que ativa TRPA1, através da modificação covalente de aminoácidos reativos induzindo a sensação de dor (Patapoutian et al., 2009). Assim, no presente estudo foi demonstrado que a administração de (-)-linalol, pelas vias sistêmicas, central e periférica, inibiu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Foi demonstrado também que a administração sistêmica de (-)-linalol, reduziu a nocicepção induzida pela injeção intratecal de cinamaldeído. Neste sentido pode-se sugerir que o cinamaldeído administrado pela via i.t. ativa diretamente os terminais centrais dos neurônios do gânglio da raiz dorsal na medula espinhal, os quais expressam o receptor TRPA1 (Bautista et al., 2006; Story et al., 2003; Kim et al., 2010), levando à liberação de glutamato, e então, promovendo a ativação de neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal. Portanto, considerando que o (-)-linalol é um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópico; com estes dados, pode-se sugerir que este composto bloqueia parte do efeito da ativação do TRPA1. Pois, foi levantada a hipótese de que a ativação de nociceptores periféricos, que expressam o TRPA1, pelo cinamaldeído, poderia causar uma liberação de glutamato que, por

sua vez, ativaria receptores glutamatérgicos em terminais periféricos vizinhos e em projeções centrais para a medula espinhal. Nesse sentido, sugere-se que o (-)-linalol possa estar agindo em receptores glutamatérgicos ionotrópicos, inibindo, então, a nocicepção induzida pelo cinamaldeído através de sua interação com o componente glutamatérgico da sua resposta.

A partir destes resultados, tornou-se importante verificar o efeito da injeção intraplantar de glutamato em camudongos com deleção gênica para o receptor TRPA1. Assim, pode-se observar neste trabalho, pela primeira vez, que o glutamato injetado na pata de animais TRPA1<sup>-/-</sup> foi capaz de causar nocicepção equivalente àquela observada em animais selvagens. Portanto, sugere-se que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece ser independente de canais TRPA1. É importante salientar que o (-)-linalol reduziu de maneira significativa a nocicepção induzida pelo glutamato em animais TRPA1<sup>-/-</sup>, sugerindo, então, que o efeito antinociceptivo do (-)-linalol foi independente da presença de receptores TRPA1.

No presente estudo demonstrou-se também que o MK801, mas não o AP-5, reduziu a nocicepção induzida pelo cinamaldeído. Neste sentido, dose subefetiva de MK801 co-administrada com dose subefetiva de (-)-linalol causou um efeito inibitório sinérgico na nocicepção induzida pelo cinamaldeído. Portanto, pode-se sugerir que o MK801 e o (-)-linalol possam estar bloqueando os receptores NMDA reduzindo a resposta nociceptiva induzida pelo cinamaldeído. Uma outra hipótese é a de que o (-)-linalol possa estar agindo em receptores TRPA1, reduzindo a resposta nociceptiva.

Sabendo que os receptores TRPA1 são co-expressos com receptores TRPV1 em fibras peptidérgicas aferentes de pequeno diâmetro (Story et al., 2003), e visto que foi observada uma inibição pelo bloqueio de receptores NMDA na resposta nociceptiva induzida pelo cinamaldeído, parece razoável sugerir que existe uma interação entre os receptores glutamatérgicos e canais TRPA1, localizados periféricamente em neurônios aferentes primários. Porém, mais estudos são necessários para investigar esta provável

interação como, por exemplo, verificar o efeito da co-administração de AP-18 e (-)-linalol bem como, de AP-18 e MK801.

Atualmente tem sido descrito que o alil isotiocianato (AITC), induz hipersensibilidade mecânica e térmica em animais, sendo revertida pelo AP-18 e HC030031, antagonistas TRPA1 (Ro et al., 2009). Dois estudos, independentemente, realizados em animais com deleção gênica para os receptores TRPA1, mostraram que os animais TRPA1<sup>-/-</sup> não foram capazes de desenvolver hipernocicepção mecânica e térmica, após a injeção intraplantar de AITC e bradicinina (Bandell et al., 2004; Kwan et al., 2006). Neste sentido, Tsagarelli e colaboradores (2010) mostraram que a injeção intradérmica de diferentes doses de cinamaldeído induz hipersensibilidades térmica e mecânica em animais selvagens, mas não em animais com deleção gênica para o TRPA1. No presente estudo, pode-se demonstrar que a injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos induziu um aumento na sensibilidade ao estímulo térmico (calor) de uma maneira dependente da dose e também da sensibilidade ao estímulo mecânico através do monofilamento de Von Frey. No entanto, é importante salientar que o (-)-linalol (100 mg/kg, v.o.) não foi capaz de reduzir de maneira significativa a hipersensibilidade ao estímulo térmico (calor) induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Ao contrário, este mesmo tratamento feito com o (-)-linalol inibiu completamente a hipersensibilidade mecânica induzida pelo agonista TRPA1, sendo que este efeito se prolongou por até seis hora após a sua administração. Estes dados estão de acordo com os dados encontrados por Bandell e colaboradores (2004), que demonstraram que a hipersensibilidade térmica induzida pelo cinamaldeído parece ser dependente de receptores TRPV1. Pois, no presente estudo verificou-se que apenas maior dose de (-)-linalol (200 mg/kg, v.o.), e não a dose de 100 mg/kg (v.o.), foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina. Coletivamente, estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo do (-)-linalol no aumento da sensibilidade mecânica induzido pelo cinamaldeído se deve, pelo menos em parte, pela sua interação com os receptores TRPA1.

Dados encontrado na literatura demonstram que o (-)-linalol é capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina (Peana et al., 2004). Neste sentido, vale ressaltar que McNamara e colaboradores (2007) demonstraram que a resposta nociceptiva induzida pela formalina é marcadamente reduzida em animais com deleção gênica para o TRPA1, e, em animais selvagens, esta resposta é revertida pelo HC-030031, antagonista TRPA1. Assim, para aprofundar o entendimento sobre a interação do (-)-linalol com os TRPs, utilizou-se a técnica de medidas da  $[Ca^{2+}]_i$  em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos e células CHO transfectadas com TRPA1 ou TRPV1.

Portanto, no presente estudo foi demonstrado que o (-)-linalol reduziu, de maneira dependente da concentração, o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo AITC em cultura de células CHO transfectadas com TRPA1. Porém, o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pela capsaicina (1  $\mu$ M) em células CHO transfectadas com TRPV1 foi revertido apenas com a maior concentração utilizada de (-)-linalol (500  $\mu$ M). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos *in vivo* no presente estudo, sugerindo então que o (-)-linalol pode estar bloqueando diretamente os canais TRPA1 e também, que este composto possui uma menor afinidade para os receptores TRPV1, uma vez que apenas a maior concentração utilizada foi capaz de bloquear a resposta induzida pela ativação deste receptor.

A partir destes resultados, buscou-se entender a interação do (-)-linalol sobre os TRPs, dentro de um sistema de maior complexidade. Assim, neste estudo, foi demonstrado que a adição do (-)-linalol (500  $\mu$ M) em cultura de neurônios do GRD induziu um aumento na  $[Ca^{+2}]_i$  em neurônios sensíveis aos agonistas TRPs (AITC, capsaicina e mentol) e em populações neuronais que não responderam aos agonistas TRPs. Neste sentido, dados da literatura demonstram que o (-)-linalol (500  $\mu$ M) aumentou a  $[Ca^{+2}]_i$  em neurônios do GRD sensíveis a ambos agonistas TRPA1 e TRPV1. Entretanto, o (-)-linalol não mostrou este efeito em populações de neurônios puramente sensíveis aos agonistas TRPV1 e TRPM8, sugerindo que o (-)-linalol ative canais TRPA1 (Riera et al., 2009). Porém, vale ressaltar que Riera e colaboradores (2009) negligenciaram o fato de o (-)-linalol poder ativar neurônios que

não são sensíveis aos agonistas TRPs. Foi encontrado também que células HEK transfectadas com TRPM8 são ativadas por altas concentrações de (-)-linalol ( $6,7 \pm 2,0$  mM), sugerindo que este composto é um agonista fraco de TRPM8 ou que este efeito não seja específico do composto devido à alta concentração utilizada no estudo (Behrendt et al., 2004). Contudo, no presente estudo o possível envolvimento de TRPM8 na ação antinociceptiva do (-)-linalol não foi estudada.

Interessantemente, no presente estudo demonstrou-se que baixas concentrações de (-)-linalol (100 e 250  $\mu$ M) inibiram a ativação de neurônios do GRD induzidas pelo AITC. Observou-se também que as respostas induzidas pelo AITC não foram devido à liberação de glutamato e sua ação sobre receptores NMDA pois, a presença de MK801 no sistema não reduziu o aumento  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo agonista TRPA1. Neste sentido, dados da literatura demonstram que em cultura de neurônios do GRD de camundongos com deleção gênica para o TRPA1, a adição de AITC no sistema não é capaz de promover um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ , sugerindo, então, que o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo AITC, deve-se a sua interação com os receptores TRPA1 (Bautista et al., 2006, Kwan et al., 2006). Em conjunto, estes dados demonstram que o efeito do (-)-linalol se deve à uma atividade antagonista sobre os canais TRPA1.

É importante salientar que, nestas condições experimentais, o uso do AITC nos experimentos *in vitro* foi devido à uma observação de que este composto ativa mais neurônios do que o cinamaldeído, portanto a observação dos efeitos do (-)-linalol sobre as respostas induzidas pela ativação dos canais TRPA1 foi mais evidente na presença de AITC do que na presença de cinamaldeído. Assim, torna-se necessário fazer uma investigação mais profunda sobre as diferenças entre as respostas induzidas pelo AITC e cinamaldeído.

É digno de nota que o sistema glutamatérgico e os receptores TRPs ativam vários sistemas intracelulares como as proteínas quinases e fosfatases (Ozawa et al., 1998; Meldrum et al., 2000; Wang et al., 2007). Neste sentido, foi demonstrado que a ativação do receptor NMDA leva à ativação de MAPKs, através de

uma via bioquímica envolvendo proteína quinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina e PI3K, contribuindo então para o desenvolvimento da plasticidade sináptica (Wang et al., 2007). Portanto, a fosforilação de proteínas quinases pode modificar a excitabilidade da membrana e contribuir para a transmissão da dor. Dentro deste contexto, sugere-se que o (-)-linalol possa inibir a fosforilação de quinases e, assim, interferir com a nocicepção induzida pelo glutamato e agonistas TRPs.

As MAPKs são uma família de enzimas que compreendem grupos ubíquos de proteínas de sinalização que regulam a transdução, amplificação e integração da sinalização celular da superfície da célula ao núcleo (Chang e Karin, 2001; Thomas e Huganair, 2004). Um subgrupo de MAPKs, a proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) é ativada por despolarização da membrana celular e influxo de íons cálcio. Esta proteína é regulada por uma cascata de fosforilações, incluindo uma dupla fosforilação nos resíduos treonina/tirosina do domínio de ativação da proteína (Payne et al., 1991). A expressão e fosforilação da ERK1/2 têm sido demonstrada em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (Averill et al., 2001). A p38 MAPK, um outro subgrupo de proteínas quinases regulada por mitógeno, tem demonstrado ter um importante papel na regulação da sensibilização da dor persistente por mecanismos neuronais e gliais (Jin et al., 2003; Schafers et al., 2003).

Uma outra proteína envolvida nos sistemas de sinalização celular do grupo das MAPKs são as proteínas c-Jun (JNKs). Comparada à ERK e p38, pouco se sabe sobre a JNK no controle da dor (Harper and LoGrasso, 2001). Uma vez ativada, a JNK ativa transloca-se para o núcleo para regular a transcrição através da fosforilação de vários fatores de transcrição como c-Jun e ATF-2 entre outros (Carboni et al., 1997; Han et al., 2001). Recentemente, foi demonstrado que, em cultura de neurônios trigeminais, a estimulação prolongada com AITC induziu um aumento nos níveis de expressão de p-JNK1 e p-c-Jun nos dias 1, 3 e 5 pós-estimulação, sendo bloqueados pelo tratamento com o inibidor de JNK, SP600125 (Wu et al., 2008). Foi demonstrado também que o 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), aldeído  $\alpha,\beta$ -insaturado endógeno que

ativa receptores TRPA1 (Trevisani et al., 2007), ativa a via da JNK (Forman et al., 2003). Neste contexto, Manning e Davis (2003) demonstraram que os inibidores de JNK, SP600125 e CEP-1347, possuem efeitos anti-inflamatórios na artrite reumatóide e outras doenças. Assim, os dados apresentados neste estudo estão de acordo com os da literatura, pois, a injeção intraplantar de cinamaldeído, induziu a fosforilação de JNK na pata, sendo reduzido pelo pré-tratamento feito com (-)-linalol. Porém, não induziu a fosforilação de p38MAPK. O tratamento feito com o inibidor de JNK (SP600125) inibiu a hipersensibilidade mecânica induzida pelo cinamaldeído. Coletivamente, estes dados sugerem que a JNK está envolvida no mecanismo de ação do (-)-linalol.

A PKC é uma outra proteína quinase que desempenha um papel muito importante na sensibilização periférica e central, sendo ativada na fibra aferente primária por várias substâncias que são liberadas em resposta a um dano tecidual (Velázquez et al., 2007). O modelo experimental utilizado para se avaliar o envolvimento da PKC na ação antinociceptiva do (-)-linalol, foi através da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de PMA. O PMA (miristato-acetato de forbol) liga-se a vários tipos de PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$  I – II,  $\gamma$ ,  $\delta$  I – III,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  I – II,  $\zeta$ ,  $\lambda$ ) e estimula a atividade catalítica da quinase (Newton, 2003; Ferreira et al., 2005). Os resultados do presente trabalho demonstram que a administração de (-)-linalol reduziu a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de PMA. Neste sentido, sugere-se que o (-)-linalol, por ser um composto hidrofóbico, possa estar atravessando a membrana plasmática e, então, inibindo diretamente a PKC.

Desta forma, os efeitos do (-)-linalol, nos modelos de nocicepção aguda aqui testados, parecem envolver receptores NMDA, TRPA1 e inibição de proteínas quinases intracelulares, principalmente JNK e PKC. Considerando as atividades até aqui descritas para este monoterpene, pode-se sugerir uma ação do (-)-linalol sobre a nocicepção crônica, embora esta última seja diferente substancialmente da nocicepção aguda em termos de persistência e alterações adaptativas (Besson, 1997; Woolf e Mannion, 1999).

A dor aguda, como a dos modelos utilizados até o momento neste estudo, tem função biológica de preservação, de

integridade e defesa do organismo, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Por outro lado, a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda de funcionalidade e da qualidade de vida da população. O tratamento da dor crônica é um dos aspectos mais desafiantes da medicina. Neste sentido, é importante salientar que os canais TRPs e os receptores glutamatérgicos contribuem para a dor crônica (Caspani et al., 2009, Petrus et al., 2007, Dai et al., 2007), principalmente os receptores NMDA e TRPA1 (Mao et al., 1992; Dicenson et al., 1997; Yoshimura e Yonehara, 2006). Portanto, as substâncias que agem inibindo estes receptores podem ser uma ferramenta importante para o tratamento da dor crônica.

O estudo de dor crônica tem sido amplamente investigado em animais de laboratório, os quais podem ser submetidos a lesões do nervo, tanto periférico, quanto central; estes modelos mimetizam a sensibilização e alterações plásticas ocorridas na dor neuropática (Zimmermann, 2001). Outro modelo de dor crônica, por exemplo, é o modelo de dor inflamatória induzida pela administração periférica de agentes indutores de reação imunológica como o CFA (Larson et al., 1986). Neste sentido, a injeção periférica de CFA ou a LPNC causa nocicepção persistente, a qual leva a liberação de múltiplos mediadores nociceptivos e inflamatórios, que aumentam a sensibilidade das vias sensoriais periféricas e centrais (Basbaum, 1999; Minami et al., 2006). Neste trabalho, a ligadura parcial do nervo ciático e a injeção i.pl. de CFA tornaram os animais hipersensíveis e responsivos frente à estímulos inócuos, sendo que este aumento da sensibilidade foi reduzido pelo pré-tratamento feito com o (-)-linalol. Estes dados estão de acordo com o trabalho publicado recentemente que demonstra que o (-)-linalol reduz a hipersensibilidade mecânica no modelo de dor neuropática induzido pela ligação do nervo espinhal (Berliocchi et al., 2009).

Além da participação dos receptores glutamatérgicos na nocicepção aguda, alguns estudos têm demonstrado importante envolvimento de receptores glutamatérgicos, principalmente dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em processos de dor neuropática (Mao et al., 1992; Dicenson et al., 1997; Yoshimura e Yonehara, 2006). Portanto, embora o mecanismo preciso dos

efeitos inibitórios do (-)-linalol ainda são incertos, é possível que a inibição do sistema glutamatérgico aponte para o efeito antinociceptivo, observado nestes modelos de dor crônica.

Além do sistema glutamatérgico, dados da literatura demonstram que o TRPA1 também está envolvido nos estados de dor crônica. Neste sentido, Petrus e colaboradores (2007) demonstraram que os animais com deleção gênica para o TRPA1, apresentaram sensibilidade mecânica aumentada aos estímulos feitos com os filamentos de VonFrey, 24 horas após a injeção intraplantar de CFA e que o inibidor de receptores TRPA1, AP18 é capaz de reverter a hipersensibilidade mecânica induzida pelo CFA em animais selvagens, porém, não em animais TRPA1<sup>-/-</sup>. Outros estudos demonstraram que em animais selvagens, os receptores TRPA1 têm sua expressão aumentada em resposta ao CFA (Obata et al., 2005; Diogenes et al., 2007; Dai et al., 2007). Neste sentido, no presente estudo, observa-se que os animais TRPA1<sup>-/-</sup> apresentaram hipersensibilidade mecânica aos monofilamentos de Von Frey, sendo que esta não foi revertida pelo pré-tratamento feito com (-)-linalol. Porém, em animais selvagens (WT), o efeito anti-hipernociceptivo do (-)-linalol foi significativo na quarta hora após o tratamento. Nossos dados sugerem, então, que o receptor TRPA1 está envolvido no mecanismo de ação antinociceptivo do (-)-linalol em modelos de nocicepção inflamatória crônica.

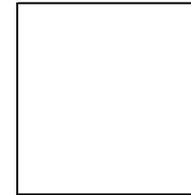
É bem reconhecido que a hipersensibilidade persistente causada pela injeção intraplantar de CFA resulta em dor inflamatória de longa duração, um efeito que é mediado por vários mediadores inflamatórios como citocinas, glutamato, óxido nítrico, protanóides, histamina, serotonina e agentes imunológicos (Raghavendra et al., 2004; Chu et al., 2005). Neste sentido, o presente estudo claramente demonstra que o tratamento prolongado dos camundongos com o (-)-linalol, reduziu a hipersensibilidade mecânica (até 6 horas) em ambos os modelos de dor crônica. É importante mencionar que os efeitos do (-)-linalol não foram suscetíveis à tolerância, pois a administração repetitiva do (-)-linalol não causou uma diminuição do seu efeito. Portanto, estes dados são completamente favoráveis a um possível uso terapêutico crônico do (-)-linalol para o tratamento da dor de longa duração.

A administração i.pl. de CFA também causou edema na pata injetada, sendo revertido pelo pré-tratamento feito com o (-)-linalol. Portanto, a ação do (-)-linalol parece estar associada com uma ação anti-inflamatória local.

A alodinia, dor evocada por estímulos normalmente inócuos, e hiperalgesia, uma sensibilidade aumentada aos estímulos nocivos ao frio, são um dos principais sintomas da dor neuropática (Zimmerman, 2001). Em modelos animais tem sido descrita a hipersensibilidade ao frio usando as técnicas da placa fria e da acetona (Jasmin et al., 1998; Seltzer et al., 1990; Choi et al., 1994, Werner et al., 2007). Dentre os termorreceptores, os receptores descritos para a detecção de frio nocivo ( $\leq 17^{\circ}\text{C}$ ) são os TRPA1 (Story et al., 2003; Peier et al., 2002) e para o frio não nocivo ( $\sim 26^{\circ}\text{C}$ ) os TRPM8 (McKemy et al., 2002). Portanto, um aumento na expressão destes canais ou uma alteração em suas propriedades funcionais, poderiam levar a um limiar de ativação mais baixo para o frio nocivo e uma sensibilidade aumentada ao estímulo frio. Trabalhos encontrados na literatura demonstraram um aumento na expressão de TRPM8 e TRPA1 e também, mudanças na sensibilidade ao frio em cultura de neurônios dos GRDs de animais neuropáticos (Caspani et al., 2009). Sendo assim, pode-se supor que o efeito inibitório do (-)-linalol no teste da placa fria e da acetona se deve a sua interação com os receptores TRPs.

Em conclusão, os resultados apresentados no presente trabalho confirmam e estendem os dados encontrados na literatura, fornecendo evidências de que o (-)-linalol exerce importante ação antinociceptiva em modelos de nocicepção aguda e crônica. Neste estudo foram obtidos avanços significativos em relação a seu mecanismo de ação, os quais permitem sugerir que o (-)-linalol possui a habilidade de bloquear receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e também de modular a atividade dos receptores TRPA1. Portanto, este estudo fornece uma perspectiva importante para a utilização terapêutica deste composto ou de seus análogos no tratamento da dor, principalmente nos estados de dor crônica. No entanto, estudos adicionais de toxicidade e clínicos são ainda necessários para confirmar a importância deste composto na clínica.





**Figura 41.** Possíveis sítios de ação do (-)-linalol (LL) com consequente redução da nocicepção. TRPA1 (receptor de potencial transitório do tipo anquirina 1); NMDAR (Receptor glutamatérgico do tipo NMDA); mGluR (receptor glutamatérgico do tipo metabotrópico); PLC (fosfolipase C); DAG (diacilglicerol); IP3 (inositol trifosfato); RE (retículo endoplasmático); MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno); PKC (proteína quinase C); PKA (proteína quinase A); DRG (gânglio da raiz dorsal).

## 6. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, pode-se concluir que:

- A administração sistêmica de (-)-linalol (v.o. e i.p.) reduz a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato e de cinamaldeído e apenas a maior dose utilizada foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por capsaicina. O (-)-linalol v.o. inibe a nocicepção induzida pelo glutamato em animais TRPA1<sup>-/-</sup>.
- A administração i.pl. de (-)-linalol inibe a nocicepção induzida pelo glutamato e cinamaldeído, porém não pela capsaicina.
- A maior dose de (-)-linalol administrada pela via i.p. é capaz de bloquear a nocicepção induzida pelos agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e SP, porém, não bloqueia a nocicepção induzida pelo agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos.
- A injeção intraplantar de cinamaldeído induz hipersensibilidade ao calor e mecânica, sendo que o (-)-linalol bloqueia apenas a hipersensibilidade mecânica, através da diminuição da fosforilação de JNK na pata.
- A inibição da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de PMA pelo (-)-linalol sugere o envolvimento da PKC na ação antinociceptiva deste composto.
- O (-)-linalol possui um efeito sinérgico com a co-administração i.pl. de MK801, antagonista de receptores NMDA, em inibir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído.
- O (-)-linalol (500  $\mu$ M) induziu aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em populações de neurônios sensíveis ou não aos agonistas TRPs em cultura de neurônios do GRD de camundongos.
- O (-)-linalol (100 e 250  $\mu$ M) inibiu o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  induzido pelo alil isotiocianato (AITC) em cultura de neurônios dos DRGs de camundongos.

- O (-)-linalol (500  $\mu$ M) inibiu o aumento da  $[Ca^{+2}]_i$  induzido pelo glutamato em neurônios do corno dorsal da medula espinhal.
- O (-)-linalol inibiu a hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) e a formação do edema induzido pela injeção intraplantar de CFA, um modelo de nocicepção inflamatória crônica. Porém, o (-)-linalol não inibiu a hipersensibilidade mecânica induzida pela administração de CFA i.pl. em camundongos TRPA1<sup>-/-</sup>.
- O (-)-linalol também foi efetivo em bloquear a hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) induzidos pela ligação parcial do nervo ciático, um modelo de dor crônica neuropática.
- A administração crônica de (-)-linalol i.p., 2 vezes ao dia, mostra que este composto não causa tolerância nos modelos do CFA e de neuropatia.

De uma forma geral, os dados obtidos no presente estudo confirmam os dados publicados anteriormente e mostram que o (-)-linalol interage com o sistema glutamatérgico e com os receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1 (TRPA1), apresentando uma importante ação antinociceptiva. Portanto, este trabalho fornece uma perspectiva importante para a utilização terapêutica deste composto ou de seus análogos no tratamento da dor, principalmente nos estados de dor crônica. Entretanto, estudos adicionais de toxicidade e clínicos são ainda necessários para confirmar a importância deste composto na clínica.

## 7. Perspectivas

- Avaliar a participação dos receptores TRPV1 na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato ou de cinamaldeído.
- Avaliar o efeito da co-administração de AP-18 e MK801 na nocicepção induzida pelo cinamaldeído i.pl., bem como o efeito da co-administração de AP-18 com (-)-linalol neste modelo experimental.
- Verificar o possível efeito do (-)-linalol no aumento das razões de fluorescências<sub>i</sub> induzidos pelo NMDA, AMPA, cainato e DHPG (agonista mGluR) em cultura de neurônios dos GRD.
- Avaliar o efeito da administração de MK801 na nocicepção induzida pelo AITC i.pl. em camundongos.

## 8. Referências Bibliográficas

Afrah AW, Stiller CO, Olgart L, Brodin E, Gustafsson H. Involvement of spinal N-methyl-d-aspartate receptors in capsaicin-induced in vivo release of substance P in the rat dorsal horn. **Neurosci. Lett.** 316: 83–86. 2000

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathway: a neuroanatomical review. **Brain Res.** 1000: 40-56. 2004.

Andrade EL, Luiz AP, Ferreira J, Calixto JB. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neurosci.** 152(2):511-20. 2008.

Averill S, Delcroix JD, Michael GJ, Tomlinson DR, Fernyhough P, Priestley JV. Nerve growth factor modulates the activation status and fast axonal transport of ERK 1/2 in adult nociceptive neurones. **Mol. Cell Neurosci.** 18(2):183-96. 2001

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron.** 41(6):849-57. 2004.

Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. **Reg. Anesth. Pain Med.** 24: 59–67.1999.

Battaglia G, Rustioni A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol.** 277(2):302-12. 1988.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell.** 124(6):1269-82. 2006

Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**. 12;448(7150):204-8. 2007.

Beeson, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**. 353:1610-15, 1999.

Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res**. 924: 219-228. 2002.

Behrendt H-J, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and canilloid receptor type 1 VR1 using fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **B. J. of Pharm**. 141: 737- 45. 2004.

Besson, J. M. e Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**. 67(1):167-86, 1987.

Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., Munson, J. B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S. B. e Priestley, J. V. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. **J Neurosci**. 18(8): 3059-72, 1998.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**. 33: 87-107.1988.

Berliocchi L, Russo R, Levato A, Fratto V, Bagetta G, Sakurada S, Sakurada T, Mercuri NB, Corasaniti MT. (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6 mice. **Int Rev Neurobiol**. 85:221-35. 2009

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 1(1):11-21. 2000.

- Bhave G. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nature Neurosc.** 4: 417-23. 2001.
- Block F, Habermeyer B. Glutamate antagonists for treatment of neuropathic pain. **Schmerz.** 17(4):261-7.2003.
- Bortolanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB. Antiallodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 25: 203–208. 2002.
- Broman J, Adahl F. Evidence for vesicular storage of glutamate in primary afferent terminals. **Neuroreport.** 5(14):1801-4. 1994
- Brum LF, Elisabetsky E, Souza D. Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. **Phytother Res.** 15(5):422-5. 2001.
- Burges PR, Perl ER. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J Physiol.** 190:541- 62. 1967.
- Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. **J. Neuro.** 18: 8056- 64.1998.
- Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol. Ther.** 106(2):179-208. 2005.
- Carboni L, Tacconi S, Carletti R, Bettini E, Ferraguti F. Localization of the messenger RNA for the c-Jun NH2-terminal kinase kinase in the adult and developing rat brain: an in situ hybridization study. **Neuros.** 80(1):147-60. 1997.

Carlton SM, Hargett GL, Coggeshall RE. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci. Lett.** 197(1):25-8. 1995.

Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. **Brain Res.** 820: 63-70. 1999.

Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS One.**4(10):e7383. 2009.

Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K.R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A.I.; Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science.** 288: 306-313, 2000.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** 389(6653):816-24. 1997.

Celik S, Ozkaya A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **J Biochem Mol Biol.**35(6):547-52. 2002.

Chadha A, Madyastha KM. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. **Xenobiotica** 14:365–374. 1984.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature.** 410(6824):37-40. 2001.

Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. e Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods.** 53(1): 55-63, 1994.

- Chapman CR, Gavrin J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**. 353: 2233 – 37. 1999.
- Childers SR. Opioid receptor-coupled second messenger systems. **Life Sci**. 48(21):1991-2003. 1991.
- Chizh BA. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: review article. **Amino Acids**. 23: 169–176. 2002
- Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM. NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. **Trends Pharmacol Sci**. 22(12):636-42. 2001.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. 59(3):369-76. 1994.
- Chu JG, Guan Y, Skinner J, Raja SN, Johns RA, Tao YX: Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**. 88:239-248, 2005
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. **Nat Rev Neurosci**. 2(6):387-96. 2001.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. **Nature**. 426(6966):517-24. 2003.
- Coderre TJ, Van Empel I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain** 59:345–352. 1994.

Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. **Neuron**. 54(3):379-86. 2007.

Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. **Nature**. 432(7018):723-30. 2004.

Cosen DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**. 224(5216):285-7. 1969.

Da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**. 148 (3): 431 – 437. 2010.

Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest**. 117(7):1979-87.2007.

Davidson EM, Carlton SM. Intraplantar injection of destrophan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. **Brain Res**. 785:136 – 142. 1998.

Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neurosci**.8:941 – 46. 1997.

Denis V, Cyert MS. Internal Ca<sup>2+</sup> release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. **J Cell Biol**. 156(1):29-34. 2002.

Derbyshire SW, Jones AK, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. **Pain**.73(3):431-45, 1997.

Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron**. 54(3):371-8. 2007.

Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation. **Annu Rev Neurosci**. 29:135-61.2006.

Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **Gen Pharmacol**. 28(5):633-8. 1997.

Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **J Dent Res**. 86(6):550-5. 2007.

Dixon, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. 20:441- 62, 1980.

Djoughri L, Lawson SN. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Brain Res Rev**.46(2):131-45. 2004.

Dray, A. e Perkins, M. N. Kinins and pain. Londres: Academic Press. The Handbook of Immunopharmacology. **The kinin system**. 57-172, 1997.

Elisabetsky E, Brum FL, Souza DO. Anticonvulsivant properties of linalool in glutamate – related seizure models. **Phytom**. 1999.

Elisabetsky E, Marschner J, Souza DO. Effects of Linalool on

glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochem Res.** 20(4):461-5. 1995.

Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner. Res.** 11: 300-305. 1996.

Ferreira J, Santos ARS, Calixto J. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginina-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharm.** 38, 835-842. 1999.

Ferreira, J.; Trichês, K.M.; Medeiros, R.; Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain.** 117: 171-181, 2005.

Forman HJ, Dickinson DA, Iles KE. HNE--signaling pathways leading to its elimination. **Mol Aspects Med.** 24(4-5):189-94. 2003.

Fürst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull.** 48(2):129-41. 1999.

Gazerani, P. Effects of subcutaneous administration of glutamate on pain, sensitization and vasomotor response in healthy men and women. **Pain.** V.124, p. 338 – 348, 2006.

Ghelardini C, Galeotti N, Salvatore G, Mazzanti G: Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Med** 65:700-703, 1999

Griffis CA, Compton P, Doering L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs.** 7(4):297-312. 2006

Grubb BD. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br J Anaesth.**81(1):8-11. 1998.

- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. **J Clin Invest.** 108(1):73-81. 2001.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. e Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, 32(1):77-88, 1988.
- Harper SJ and LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurons: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. **Cell Signal.** 13(5):299 – 310. 2001.
- Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. **Neuron.** Apr;8(4):643-51. 1992.
- Hill RG. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist.** 7: 282-292. 2001.
- Hu H-J, Bhawe G, Gereau IV RW. Prostaglandin and protein Kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **J Neurosci.** 22:7444-7452, 2002.
- Hudspeth MJ. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br J Anaesth.** 78(6):731-47. 1997.
- Hunt, S. P. e Mantyh, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci.** 2(2): 83-91, 2001.
- Hunt, S. P. e Rossi, J. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 308 (1136) 283-9, 1985.

Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** 67: 313–316. 1980.

Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol.** 284(3):321-5. 1995.

Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **J Biol Chem.** 274(11):7325-33. 1999.

Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain.** 75(2-3):367-82. 1998

Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **J Neurosci.** 23(10):4017-22. 2003.

Jin YH, Nishioka H, Wakabayashi K, Fujita T, Yonehara N. Effect of morphine on the release of excitatory amino acids in the rat hind step: pain is modulated by the interaction between the peripheral opioid and glutamate system. **Neurosc.** 138:1329 – 1339. 2006.

Jin YH, Yamaki F, Takemura M, Koike Y, Furuyama A, Yonehara N. Capsaicin-induced glutamate release is implicated in nociceptive processing through activation of ionotropic glutamate receptors and group I metabotropic glutamate receptor in primary afferent fibers. **J Pharmacol Sci.** 109(2):233-41. 2009.

Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., Mckemy, D. D., Zygmunt, P. M., Hogestatt, E. D., Meng, I. D. e Julius, D. Mustard oils and

cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**. 427 (6971) 260-5, 2004.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413(6852):203-10. 2001.

Kang K, Pulver SR, Panzano VC, Chang EC, Griffith LC, Theobald DL, Garrity PA. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**. 464(7288):597-600. 2010.

Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Sakagami, M. e Noguchi, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp Neurol**. 200 (1) 112-23, 2006.

Kim SH, Lee Y, Akitake B, Woodward OM, Guggino WB, Montell C. *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107(18):8440-5. 2010.

Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. **J. Neuroimmunol**. 149: 77-83, 2004.

Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **The Journal Neurosci**. 27(16):4443-4451, 2007.

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**. 50(2):277-89. 2006

Lam DK, Sessle BJ, Cairns BE, Hu JW. Peripheral NMDA receptor

modulation of jaw muscle electromyographic activity induced by capsaicin injection into the temporomandibular joint of rats. **Brain Res.** 1046:68–76. 2005.

Lam DK, Sessle BJ, Hu JW. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents. **Brain Res.**1251:130-9. 2009.

Lapa Fda R, Gadotti VM, Missau FC, Pizzolatti MG, Marques MC, Dafré AL, Farina M, Rodrigues AL, Santos AR. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 104(4):306-15.2009.

Larson AA, Brown DR, el-Atrash S, Walser MM. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. **Pharmacol Biochem Behav.** 24(1):49-53. 1986.

Larsson M. Ionotropic Glutamate Receptors in Spinal Nociceptive Processing. **Mol Neurobiol.** 40:260–288. 2009.

Lima-Júnior RC, Sousa DI, Brito GA, Cunha GM, Chaves MH, Rao VS, Santos FA. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflamm Res.** 56(12):487-94. 2007.

Lis-Balchin M, Hart S. Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). **Phytother Res.** 13(6):540-2. 1999.

Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature.** 386:721–724.1997.

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 8383-8387. 1994.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. **Lancet.** 353(9164):1607-9. 1999

Lutfy K, Cai SX, Woodward RM, Weber E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain.** 70(1):31-40. 1997.

Malmberg, A.B.; Basbaum, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain.** 76: 215-22, 1998.

Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? **Nat Rev Drug Discov.**2(7):554-65.2003.

Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DJ. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Res.** 598(1-2):271-8. 1992.

Marvizon JCG, Martinez G, Grady EF, Bunnnett NW, Mayer EA. Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. **J. Neurosci.** 17: 8129–8136. 1997.

McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role of TRP channels in thermosensation. **Nature.** 2002.

McMahon, S. B., Cafferty, W. B. e Marchand, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol.**192, 2005

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger

CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A.**104(33):13525-30. 2007.

Mcperson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr Biol.** 15(10):929-34. 2005.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr.** 130(4S Suppl):1007S-15S. 2000.

Mendell, J. R. e Sahenk, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med.** 348(13)1243-55. 2003.

Meotti FC, Coelho ID, Santos AR. The Nociception Induced by Glutamate in Mice Is Potentiated by Protons Released into the Solution. **J Pain.**11(6):570-578. 2010

Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: Seattle: International Association for the Study of Pain. **Press** v.210, 1994

Michael, G. J., Kaya, E., Averill, S., Rattray, M., Clary, D. O. e Priestley, J. V. TrkA immunoreactive neurones in the rat spinal cord. **J Comp Neurol.** 385(3):441-55, 1997.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** 1999.

Minami M, Katayama T, Satoh M. Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. **J. Pharmacol. Sci.** 100: 461–470. 2006.

Mjellem-Joly N, Lund A, Berge OG, Hole K. Intrathecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. **Pain** 51:195–198. 1992.

- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci STKE**. (272):re3. 2005.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**. 2(4):1313-23. 1989.
- Naguib M, Yaksh TL. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. **Anesth Analg**. 85(4):847-53. 1997
- Nagy, J. I. e Hunt, S. P. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. **Neurosci**.7(1):89-97, 1982.
- Nakanishi N, Axel R, Shneider NA. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 89(18):8552-6. 1992.
- Neugebauer V. Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**. 98(1-2):1-8. 2002.
- Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem J**. 370(Pt 2):361-71. 2003.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev**. 87(1):165-217. 2007.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T. Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. **EMBO J**. 27(21):2809-16. 2008.

Nordlind K, Johansson O, Liden S, Hokfelt T. Glutamate- and aspartate-like immunoreactivities in human normal and inflamed skin. **Virchows Archiv. B. Cell Path. Inclu. Mol. Path.**64: 75 – 82, 1993.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest.** 115(9):2393-401. 2005

Olsson, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Crit Rev Neurobiol.** 5(3):265-311, 1990.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 54: 581-618. 1998.

Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A.**98(14):7801-5. 2001.

Parsons CG. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **Eur. J. Pharm.** 429:71-78. 2001

Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov.** 8(1):55-68. 2009.

Pasero C, Paice J, McCaffery M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. Em: Mc Caffery & Pasero, C. (eds). **Pain Clinical Manual.** St Louis, MO: Mosby, pp. 15 – 34, 1999.

Paszczuk AF, Gadotti VM, Tibola D, Quintão NL, Rodrigues AL, Calixto JB, Santos AR. Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. **Brain Res.** 23: 124-133. 2007

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). **EMBO J.** 10(4):885-92.1991.

Peana AT, Moretti MD, Juliano C. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *S. sclarea*. **Planta Med.** 65(8):752-4.1999.

Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MD. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytom.** 2002.

Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti MD, Serra G, Pippia P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **Eur J Pharmacol.** 460(1):37-41. 2003

Peana AT, De Montis MG, Nieddu E, Spano MT, D'Aquila PS, Pippia P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **Eur J Pharmacol.** 485(1-3):165-74. 2004

Peana AT, De Montis MG, Sechi S, Sircana G, D'Aquila PS, Pippia P. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **Eur J Pharmacol.** 2004

Peana AT, Rubattu P, Piga GG, Fumagalli S, Boatto G, Pippia P, De Montis MG. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sci.** 78:2471 – 2474, 2005.

Peana AT, Rubattu P, Piga GG, Fumagalli S, Boatto G, Pippia P, De Montis MG. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sci,** 78(21):2471-4. 2006.

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**. 108(5):705-15. 2002.

Perry NS, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. **J Pharm Pharmacol**. 52(7):895-902. 2000.

Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Mol. Pain**. 40:1 – 8. 2007.

Pietraszek M. The role of group I metabotropic glutamate receptors in schizophrenia. **Amino Acids**.32:173 – 178. 2007.

Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci**. 20(2):467-73. 2004.

Raja S, Meyer R, Campbell J. Peripheral neural mechanisms of nociception. Em: Wall, P & Melzack R. (eds). **Textbook of pain**. New York: Churchill, Livingstone, pp. 2323-2350, 1999.

Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, Scarpantonio A, Rinaldi L, Mosca E. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. **Pharmacol Res**. 42(2):177-82. 2000

Riera CE, Menozzi-Smarrito C, Affolter M, Michlig M, Munari C, Robert F, Vogel H, Simon SA, le Coutre J. Compunds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. **B. J. Pharmacol**. 157: 1398 – 1409, 2009.

- Ro JY, Lee JS, Zhang Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. **Pain**.144(3):270-7.2009.
- Robertson B, Xu XJ, Hao JX, Wiesenfeld-Hallin Z, Mhlanga J, Grant G, Kristensson K. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. **Neuroreport**. 8: 1311–1316. 1997.
- Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. **Pain**. 135(3):271-9.2007.
- Rusin KI, Jiang MC, Cerne R, Randic M. Interactions between excitatory amino acids and tachykinins in the rat spinal dorsal horn. **Brain Res. Bull**. 30:329–338. 1993.
- Russo, C. M. e Brose, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**. 49:123-33,1998.
- Sakurada T, Sugiyama A, Sakurada C, Tan-No K, Yonezawa A, Sakurada S, Kisara K. Effect of spinal nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sci**. 59(11):921-30. 1996
- Santos AR, Gadotti VM, Oliveira GL, Tibola D, Paszcuk AF, Neto A, Spindola HM, Souza MM, Rodrigues AL, Calixto JB. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharm**. 48(7):1021-34. 2005.
- Scheidt C, Santos ARS, Ferreira L, Malheiros A, Cechinel-filho V, Yunes RA, Calixto JB. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharm**. 43:340–347. 2002.

Seltzer, Z.; Dubner, R.; Shir, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. **Pain**. 43: 205-18, 1990.

Schäfers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. **Pain**. 104(3):579-88. 2003.

Shigemoto R, Ohishi H, Nakanishi S, Mizuno N. Expression of the mRNA for the rat NMDA receptor (NMDAR1) in the sensory and autonomic ganglion neurons. **Neurosci. Lett**. 144: 229-232. 1992.

Silva Brum LF, Emanuelli T, Souza DO, Elisabetsky E. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochem Res**. 2001.

Silverman, J. D. e Kruger, L. Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. **J Neurocytol**. 19(5):789-801, 1990.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. 112(6):819-29. 2003.

Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Res Rev**. 60(1):2-23. 2009.

Stucky, C. L. e Lewin, G. R. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. **J Neurosci**. 19(15):6497-505, 1999.

Tadano T, Namioka M, Nakagawasai O, Tan-No K, Matsushima K, Endo Y, Kisara K. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sci.** 65: 255–261. 1999.

Takahashi M, Afford S. The requirement of presynaptic metabotropic glutamate receptors for the maintenance of locomotion. **J. Neurosci.** 22:3692 – 3699. 2002.

Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci.** 5(3):173-83. 2004.

Tjølsen A, Hole K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., **The Pharma. of Pain.** Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1-20. 1997.

Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. **Eur J Neurosci.** 17(1):13-27. 2003.

Tominaga, M.; Caterina, M.J.; Malmberg, A.B.; Rosen, T.A.; Gilbert, H., Skinner, K.; Raumann, B.E.; Basbaum, A.I.; Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron.** 21: 531-543, 1998.

Treede, R. D., Kenshalo, D. R., Gracely, R. H. e Jones, A. K. The cortical representation of pain. **Pain.** 79(2-3):105-11, 1999.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, André E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A.**104(33):13519-24. 2007

Tsagareli MG, Tsiklauri N, Zanotto KL, Carstens MI, Klein AH, Sawyer CM, Gurtskaia G, Abzianidze E, Carstens E. Behavioral evidence of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by intradermal cinnamaldehyde in rats. **Neurosci Lett.** 473(3):233-6.2010.

Velázquez RA, Kitto KF, Larson AA. CP-96,345, which inhibits [3H] substance P binding, selectively inhibits the behavioral response to intrathecally administered N-methyl-D-aspartate, but not substance P, in the mouse. **J Pharmacol Exp Ther.** 281(3):1231-7.1997.

Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. **Annu Rev Biochem.**76:387-417. 2007.

Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. **Nat Chem Biol.** 1(2):85-92. 2005.

Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. **J Neurochem.** 100(1):1-11. 2007.

Warnecke T, Jorum E, Stubhaug A. Local treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine, inhibits development of secondary hyperalgesia in man by a peripheral action. **Neur. Letters.** 227:1-4, 1997.

Werner MFP, Kassuya CA, Ferreira J, Zampronio AR, Calixto JB, Rae GA. Peripheral Kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacol.** 53:48 – 57, 2007.

- Wiech K, Kiefer RT, Töpfner S, Preissl H, Braun C, Unertl K, Flor H, Birbaumer N. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesth Analg.** 98(2):408-13, 2004.
- Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Int.** 45: 389-395, 2004.
- Willis, W. D. e Coggeshall, R. E. Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. New York: **Plenum Press.** 595. 1991
- Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron.** 55(3):353-64.2007.
- Woolf, C. J. and Mannion, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet.** 353(9168):1959-64, 1999.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science.** 288(5472):1765-9. 2000
- Wrigley PJ, Jeong HJ, Vaughan CW. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. **Br J Pharmacol.** 157(3):371-80. 2009.
- Wu J, Zhang X, Nauta HJ, Lin Q, Li J, Fang L. JNK1 regulates histone acetylation in trigeminal neurons following chemical stimulation. **Biochem Biophys Res Commun.** 376(4):781-6. 2008.
- Yoshimura M, Jessell T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. **J Physiol.** 430:315-35. 1990.
- Yoshimura M, Yonehara N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute

to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. **Neurosci Res.** 56(1):21-8. 2006.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16(2):109-10, 1983.

Zimmermann, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol.**129(1-3):23-37, 2001.

Zhou S. Metabotropic glutamate 1alpha receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. **Brain Research.** 91:18-26. 2001.

**ANEXOS**

