

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

**JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES**

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS CANAIS  
DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM E  
DE CANAIS TRPV1 POR (-)-CARVONA**

JOÃO PESSOA – PB

2011

**JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES**

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS CANAIS  
DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM E  
DE CANAIS TRPV1 POR (-)-CARVONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de **Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, área de concentração: **Farmacologia**.

**Orientador:**

Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo

JOÃO PESSOA – PB

2011

G635m

*Gonçalves, Juan Carlos Ramos.*

Modulação da atividade dos canais de sódio dependentes de voltagem e de canais TRPV1 por (-)-Carvona / Juan Carlos Ramos Gonçalves. - - João Pessoa: [s.n.], 2011.

131f. : il.

*Orientador: Demetrius Antônio Machado de Araújo.*

*Tese (Doutorado) – UFPB/CCS.*

1. *Produtos naturais.* 2. *Monoterpenos.* 3. *(-)-Carvona.*  
4. *Nocicepção.* 5. *Patch-clamp* 6. *Expressão heteróloga.*

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES**

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS CANAIS  
DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM E  
DE CANAIS TRPV1 POR (-)-CARVONA**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo**  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Orientador

**Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira**  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Avaliador interno

**Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga**  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Avaliador interno

**Prof. Dr. Sávio Torres de Farias**  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Avaliador externo

**Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich**  
Universidade de São Paulo – USP  
Avaliador externo

**Prof. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB  
Suplente

**Aos meus queridos pais e irmãos,  
dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por conceber beleza e harmonia ao nosso universo, e por ter me permitido vivenciá-las e estudá-las.

Aos **meus pais, irmãos e familiares**, pelo constante apoio e incentivo ao longo da minha trajetória.

Ao Prof. Dr. **Demetrius Antônio Machado de Araújo**, pela amizade e valorosa orientação deste trabalho, sempre conferindo suporte à minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Alexander Henning Ulrich** (IQ/USP), pela constante disponibilidade e grande contribuição para o desenvolvimento deste estudo.

Aos Profs. Drs. **Marco Antônio M. Prado** e **Vânia F. Prado** (Robarts Res. Inst./UWO, Canadá), pela primorosa orientação e apoio durante o meu período de doutorado no exterior.

Aos Drs. **Michael F. Jackson** (Robarts Res. Inst./UWO, Canadá) e **David Julius** (UCSF, EUA), pela indispensável colaboração no estudo com canais TRPs.

À Profa. Dra. **Maria de Fátima Agra**, pelo empenho constante em consolidar o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nível de excelência.

Aos membros da banca de qualificação, os Profs. Drs. **Bagnólia A. Silva**, **Sandra R. Mascarenhas** e **Valdir de A. Braga**, pelas contribuições que permitiram enriquecer este trabalho.

A **todos** os colegas integrantes do Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular, **Alethéia Lacerda**, **Marcos Medeiros**, **Gláucia Faheina**, **Aron Miranda**,

**Anna Erika, Danilo Menezes, Aliny Vasconcelos, Hervé Couliadiati, Tereza Cristina, Itácio Padilha, Bruna Braga, Caio César, Vanessa Medeiros, Milena Ramos, Fabrícia Montenegro e Jaislânia Lucena** pela colaboração, apoio e amizade, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus fiéis amigos e pesquisadores, **Thais Porto, Micheline Donato e Ionaldo Diniz**, pelo suporte acadêmico e, sobretudo, amizade, sempre presentes ao longo da nossa formação.

A **todos** os integrantes do Laboratório de Neurociências (IQ/USP), em especial **Hellio D. de Sousa, Arthur Nery e Telma Tiemi** pelo companheirismo e colaboração a mim prestados durante meus experimentos em São Paulo.

A **todos** os pesquisadores e funcionários do *Prado's Lab* (Robarts Research Institute/UWO, Canadá), em especial **Ivana Souza, Flávio Beraldo, André Guimarães, Fabiana Caetano, Xavier de Jaeger, Ashbeel Roy e Ana Cristina**, pela excelente recepção, companheirismo e auxílio experimental, durante o meu doutorado “sanduíche” no exterior.

A **todos os funcionários** do Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB), que contribuem diariamente para a manutenção do nosso ambiente de trabalho.

Às agências de fomento **CAPES** e **CNPq**, pelo auxílio financeiro que viabilizou a execução deste estudo.

A **todos** que contribuíram direta ou indiretamente durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

***“Corra, coelho corra.  
Cave um buraco, não se importe com o sol.  
E quando afinal o trabalho estiver terminado,  
Não se acomode, pois estará na hora de cavar novamente.”***

**Breathe - Pink Floyd  
(Roger Waters)**

## RESUMO

Dentre os produtos de origem natural com propriedades analgésicas comprovadas experimentalmente, destacam-se os monoterpenos, tidos como os principais constituintes químicos dos óleos essenciais de plantas aromáticas. A (-)-carvona é um exemplo de monoterpeneo com propriedades antinociceptivas, encontrada como o principal constituinte ativo dos óleos de algumas espécies do gênero *Mentha*. Uma vez que o mecanismo antinociceptivo periférico de (-)-carvona não está estabelecido, o presente trabalho se propõe a melhor caracterizá-lo. Inicialmente realizou-se um estudo estrutura-atividade, onde foi possível demonstrar a importância do grupo carbonila ligado à molécula de (-)-carvona, durante o seu efeito bloqueador da excitabilidade nervosa periférica de rato, e ainda, que a substituição desse grupo por uma hidroxila potencializou esse efeito. Após demonstrarmos que (-)-carvona possuía baixa citotoxicidade, investigou-se os efeitos desse monoterpeneo sobre os canais de sódio dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) e nos canais receptores de potencial transiente vanilóides 1 (TRPV1), envolvidos na nocicepção periférica, utilizando-se neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de rato. Por meio da técnica de *Whole-cell Patch-clamp* foi possível demonstrar que (-)-carvona (1 mM) foi capaz de reduzir o influxo de  $\text{Na}^+$  de  $8,7 \pm 1,6$  nA (controle) para  $5,3 \pm 1,1$  nA ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, através de ensaios de microscopia de fluorescência, observou-se que (-)-carvona aumentou os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios DRG, possivelmente via canais TRPV1. O envolvimento desses canais foi posteriormente confirmado por antagonismo específico e por expressão heteróloga em HEK 293, por transfecção dessas células com cDNA-TRPV1 de *Rattus norvegicus*. Em seguida, demonstrou-se que (-)-carvona atua sobre o canal TRPV1, de modo dependente de concentração, promovendo a sua dessensibilização. Adicionalmente, foi descartada a participação de outro canal TRP envolvido na dor, como o TRPM2, durante o efeito de (-)-carvona. Portanto, o presente estudo evidenciou que a substituição do grupamento carbonila por uma hidroxila na molécula de (-)-carvona poderia aumentar a eficiência desse monoterpeneo na redução da excitabilidade nervosa periférica. Este efeito foi demonstrado como sendo resultante do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$ , bem como pela ativação e posterior dessensibilização de canais TRPV1, indicando a grande potencialidade deste monoterpeneo como uma molécula antinociceptiva periférica ou protótipo de nova droga analgésica.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Monoterpenos. (-)-Carvona. Nocicepção. Patch-clamp. Expressão heteróloga.

## ABSTRACT

Among the natural products with experimentally proven analgesic properties, the monoterpenes are of great importance, recognized as the main chemical constituents of essential oils from aromatic plants. (–)-Carvone is an example of monoterpene with antinociceptive properties, founded as the main active constituent of oils from some species of the genus *Mentha*. Since the peripheral antinociceptive mechanism of (–)-carvone is not well established, this study aimed to better characterize it. Initially, it was performed a structure-activity study by which was possible to demonstrate the importance of the carbonyl group into the molecule of (–)-carvone, during its blocking effect in the rat peripheral nervous excitability, as also that the replacement of that group for a hydroxyl enhanced this effect. After shown that (–)-carvone had low cytotoxicity, we investigated the effects of this monoterpene in the voltage-gated sodium channels of ( $\text{Na}_v$ ) and the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), involved in peripheral nociception, using neurons from the dorsal root ganglion (DRG) of rats. With the technique of Whole-cell Patch-clamp it was demonstrated that (–)-carvone (1 mM) was able to reduce  $\text{Na}^+$  influx from  $8.7 \pm 1.6$  nA (control) to  $5.3 \pm 1.1$  nA ( $p < 0.05$ ). Later, by fluorescence microscopy assays, we observed that (–)-carvone increased the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in DRG neurons, possibly via TRPV1 channels. The involvement of these channels was further confirmed by specific antagonism and heterologous expression in HEK 293 by transfecting these cells with TRPV1-cDNA of *Rattus norvegicus*. Then we demonstrated that (–)-carvone acts in the TRPV1 channel in a concentration-dependent manner, promoting its desensitization. Additionally, it was discarded the participation of another TRP channel involved in pain, the TRPM2, during the effect of (–)-carvone. Therefore, this study showed that the replacement of a carbonyl by a hydroxyl group in the molecule of (–)-carvone could increase the efficiency of this monoterpene in reducing the peripheral nerve excitability. Such effect was demonstrated as being a result of the  $\text{Na}_v$  channel blockade, as well as the activation and subsequent desensitization of TRPV1 channels, indicating the great potential of this monoterpene as a peripheral antinociceptive molecule or prototype of a novel analgesic drug.

**Keywords:** Natural products. Monoterpenes. (–)-Carvone. Nociception. Patch-clamp. Heterologous expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	As vias da nocicepção periférica .....	<b>22</b>
<b>Figura 2</b>	Os neurônios DRG e a transmissão sensorial .....	<b>24</b>
<b>Figura 3</b>	O canal de Na <sup>+</sup> dependente de voltagem .....	<b>29</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura molecular dos canais Termo-TRP envolvidos na nocicepção e a sua ativação por compostos de origem natural .....	<b>31</b>
<b>Figura 5</b>	Representação estrutural do canal TRPV1 e seus sítios de modulação .....	<b>35</b>
<b>Figura 6</b>	Exemplos de monoterpenos biologicamente ativos .....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b>	Monoterpenos com ação sobre canais TRP .....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura química dos enantiômeros de carvona .....	<b>40</b>
<b>Figura 9</b>	Representação do processo de clonagem em bactérias .....	<b>48</b>
<b>Figura 10</b>	Cultura primária de neurônios DRG de rato .....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b>	Representação esquemática da técnica de <i>single sucrose gap</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 12</b>	Registro típico do PAC obtido por meio da técnica de <i>single sucrose gap</i> e seus parâmetros .....	<b>52</b>
<b>Figura 13</b>	Técnica de Patch-clamp em neurônio DRG de pequeno diâmetro ...	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Monitoramento do Ca <sup>2+</sup> intracelular pelo Fluo-3/AM .....	<b>55</b>
<b>Figura 15</b>	Transfecção transiente pelo método do fosfato de cálcio .....	<b>59</b>
<b>Figura 16</b>	Transfecção de células HEK 293 pelo método do fosfato de cálcio ..	<b>59</b>
<b>Figura 17</b>	Co-transfecção de TRPV1 e m-Cherry em células HEK 293 .....	<b>60</b>
<b>Figura 18</b>	Monitoramento do Ca <sup>2+</sup> intracelular pelo Fura-2 .....	<b>55</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito de (+)-carvona sobre o PAC de nervo periférico de rato .....	<b>65</b>
<b>Figura 20</b>	Reversibilidade dos efeitos de (-)- e (+)-carvona sobre o PAC de nervo periférico de rato .....	<b>66</b>
<b>Figura 21</b>	Análogos estruturais de carvona usados no estudo estrutural-atividade .....	<b>68</b>
<b>Figura 22</b>	Reversibilidade dos efeitos de (-)-carveol, carvacrol e (+)-limoneno sobre o PAC de nervo periférico de rato .....	<b>69</b>
<b>Figura 23</b>	Determinação da viabilidade de células HEK 293 por citometria de fluxo .....	<b>72</b>

<b>Figura 24</b>	Efeito de (-)-carvona sobre a viabilidade de células HEK 293 .....	<b>73</b>
<b>Figura 25</b>	Caracterização das correntes totais de Na <sup>+</sup> em neurônios DRG .....	<b>75</b>
<b>Figura 26</b>	Efeito de (-)-carvona sobre as correntes totais de Na <sup>+</sup> em neurônios DRG .....	<b>77</b>
<b>Figura 27</b>	Indução da expressão de canais TRPM2 em células T-Rex .....	<b>86</b>
<b>Figura 28</b>	Análise de restrição do plasmídeo clonado com TRPV1 .....	<b>90</b>
<b>Figura 29</b>	Análise da sequencia do cDNA-TRPV1 purificado .....	<b>91</b>
<b>Figura 30</b>	Efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 expressos em HEK 293 .....	<b>93</b>
<b>Figura 31</b>	Mecanismo de ação antinociceptivo de (-)-carvona sobre o SNP ....	<b>109</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Classificação das fibras nervosas .....	<b>24</b>
<b>Quadro 2</b>	Tipos de receptores opióides e seus efeitos farmacológicos .....	<b>25</b>
<b>Quadro 3</b>	Os canais Termo-TRP envolvidos na dor e os seus respectivos ativadores e bloqueadores .....	<b>33</b>

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	Comparação dos efeitos de (-)- e (+)-carvona (10 mM) sobre as características do PAC .....	<b>67</b>
-----------------	--	-----------

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Dependência de concentração de (-)- e (+)-carvona sobre o bloqueio da excitabilidade nervosa .....	<b>65</b>
<b>Gráfico 2</b>	Reversibilidade dos efeitos de (-)- e (+)-carvona sobre $V_{PAC}$ .....	<b>66</b>
<b>Gráfico 3</b>	Reversibilidade dos efeitos de (+)-limoneno, (-)-carveol e carvacrol sobre $V_{PAC}$ .....	<b>69</b>
<b>Gráfico 4</b>	Estabelecimento do efeito dos análogos de carvona durante 30 min de incubação .....	<b>70</b>
<b>Gráfico 5</b>	Citotoxicidade de (-)-carvona em neurônios DRG .....	<b>71</b>
<b>Gráfico 6</b>	Avaliação da citotoxicidade de (-)-carvona em células HEK 293 .....	<b>73</b>
<b>Gráfico 7</b>	Relação corrente/voltagem de canais $Na_v$ em neurônios DRG .....	<b>76</b>
<b>Gráfico 8</b>	Efeito de (-)-carvona sobre os níveis de $Ca^{2+}$ em neurônios DRG ....	<b>79</b>
<b>Gráfico 9</b>	Influência do $Ca^{2+}$ externo sobre os efeitos de (-)-carvona em neurônios DRG .....	<b>80</b>
<b>Gráfico 10</b>	Investigação dos receptores envolvidos no efeito de (-)-carvona sobre os níveis de $Ca^{2+}$ em neurônios DRG .....	<b>81</b>
<b>Gráfico 11</b>	Bloqueio do efeito da capsaicina em neurônios DRG por antagonismo do canal TRPV1 .....	<b>82</b>
<b>Gráfico 12</b>	Bloqueio do efeito de (-)-carvona em neurônios DRG pelo vermelho de rutênio (Verm-Ru) e capsazepina (CPZ) .....	<b>83</b>
<b>Gráfico 13</b>	Efeito de (-)-carvona sobre as concentrações intracelulares de $Ca^{2+}$ em neurônios DRG .....	<b>84</b>
<b>Gráfico 14</b>	Expressão de canais TRPM2 em células T-REx/TRPM2 .....	<b>87</b>
<b>Gráfico 15</b>	Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2 .....	<b>88</b>
<b>Gráfico 16</b>	Expressão heteróloga de canais TRPV1 em células HEK 293 .....	<b>92</b>
<b>Gráfico 17</b>	Efeito dependente da concentração de (-)-carvona ((-)-CV) sobre o aumento dos níveis de $Ca^{2+}$ em células HEK transfectadas com TRPV1 .....	<b>94</b>
<b>Gráfico 18</b>	Bloqueio do efeito de (-)-carvona em HEK 293 expressando TRPV1 .....	<b>95</b>
<b>Gráfico 19</b>	Avaliação da dessensibilização dos canais TRPV1 por (-)-carvona ..	<b>97</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>(-)-Cv</b>	(-)-Carvona
$\tau_{rep}$	Constante de tempo de repolarização
<b>A/D</b>	Analógico/Digital
<b>A<sub>PAC</sub></b>	Amplitude do potencial de ação composto em mV
<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>e.p.m</b>	Erro padrão da média
<b>CPZ</b>	Capsazepina
<b>Cap</b>	Capsaicina
<b>C<sub>m</sub></b>	Capacitância de membrana
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>HEPES</b>	Ácido-N-[2-Hidroxietil]-Piperazina-N'-[2-Etanossulfônico]
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>HEK</b>	Células embrionárias de tecido renal humano
<b>DRG</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>I<sub>Na+</sub></b>	Corrente total de sódio
<b>Iono</b>	Ionomicina
<b>K<sub>v</sub></b>	Canais de potássio dependentes de voltagem
<b>KRH</b>	Solução fisiológica de Hank-Ringer-HEPES
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canais de sódio dependentes de voltagem
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PAC</b>	Potencial de ação composto
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>TP<sub>PAC</sub></b>	Tempo para atingir o pico do potencial de ação composto
<b>VD<sub>PAC</sub></b>	Velocidade de despolarização do potencial de ação composto
<b>Verm-Ru</b>	Vermelho de rutênio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Fundamentos do estudo da dor .....	<b>20</b>
1.1.1 Classificação geral .....	<b>20</b>
1.1.2 Visão geral da transmissão da dor .....	<b>21</b>
1.1.3 As bases moleculares da nocicepção .....	<b>25</b>
1.2 A excitabilidade neuronal e o potencial de ação composto (PAC) .....	<b>26</b>
1.2.1 Os canais de Na <sup>+</sup> dependentes de voltagem (Na <sub>v</sub> ) .....	<b>28</b>
1.3 Os canais receptores de potencial transiente (TRP) .....	<b>29</b>
1.3.1 O canal TRPV1 e a nocicepção .....	<b>34</b>
1.4 O controle farmacológico da dor .....	<b>35</b>
1.5 Produtos naturais e sintéticos bioativos .....	<b>36</b>
1.5.1 Os óleos essenciais e seus constituintes .....	<b>37</b>
1.6 Propriedades químicas e biológicas de (-)-carvona .....	<b>40</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
2.1 Objetivo geral .....	<b>44</b>
2.2 Objetivos específicos .....	<b>44</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 Animais .....	<b>46</b>
3.2 Sais e reagentes .....	<b>46</b>
3.2.1 Diluições .....	<b>47</b>
3.2.2 Soluções fisiológicas .....	<b>47</b>
3.3 Cultivo celular .....	<b>48</b>

3.3.1	Cultura primária de neuronios DRG .....	48
3.3.2	Cultura da linhagem HEK 293 .....	49
3.4	Ensaio de citotoxicidade celular .....	49
3.4.1	Teste do vermelho neutro .....	49
3.4.2	Determinação da integridade da membrana celular .....	50
3.5	Ensaio eletrofisiológico .....	50
3.5.1	Técnica de registro extracelular do PAC .....	50
3.5.2	Técnica de <i>Patch-clamp</i> .....	53
3.5.2.1	Obtenção de correntes totais de Na <sup>+</sup> em neurônios DRG .....	53
3.6	Monitoramento da concentração de Ca <sup>2+</sup> em neurônios DRG .....	55
3.7	Avaliação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2 .....	56
3.7.2	Monitoramento do Ca <sup>2+</sup> intracelular em células T-REx/TRPM2 .....	56
3.8	Avaliação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 .....	57
3.8.1	Ensaio em biologia molecular .....	57
3.8.1.1	Vetores .....	57
3.8.1.2	Transformação bacteriana .....	57
3.8.1.3	Verificação da presença de inserto .....	58
3.8.2	Transfecção transiente pelo método do fosfato de cálcio .....	58
3.8.3	Expressão heteróloga de canais TRPV1 em células HEK 293 .....	60
3.8.4	Monitoramento do Ca <sup>2+</sup> intracelular em células HEK 293 expressando TRPV1 .....	60
3.9	Análises estatísticas .....	62
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
	Avaliação estrutura-atividade dos análogos de (-)-carvona sobre a excitabilidade do nervo periférico de rato .....	64
4.2	Determinação da citotoxicidade de (-)-carvona .....	70

4.2.1 Citotoxicidade de (-)-carvona em neurônios DRG .....	71
4.2.2 Citotoxicidade de (-)-carvona em células HEK 293 .....	72
4.3 Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais de sódio dependentes de voltagem .....	74
4.3.1 Isolamento de correntes totais de Na <sup>+</sup> em neurônios DRG .....	74
4.3.2 Efeito de (-)-carvona sobre as correntes totais de Na <sup>+</sup> em neurônios DRG .....	76
4.4 Investigação dos efeitos de (-)-carvona sobre os níveis de Ca <sup>2+</sup> em neurônios DRG .....	78
4.4.1 Influência do Ca <sup>2+</sup> interno e externo sobre o efeito de (-)-carvona .....	79
4.4.2 Investigação dos receptores envolvidos no efeito de (-)-carvona .....	81
4.6 Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2 .....	84
4.7 Expressão heteróloga de canais TRPV1 em HEK 293 .....	89
4.7.1 Efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 .....	92
4.7.2 Avaliação da resposta de TRPV1 frente às sucessivas exposições por (-)-carvona .....	96
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>99</b>
5.1 Mapa conceitual .....	109
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>113</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>131</b>

# Introdução

---

## **1 INTRODUÇÃO**

A dor é uma sensação geralmente desagradável, resultante da interação complexa entre mecanismos sensoriais e cognitivos, enquanto que o termo nocicepção, relaciona mais especificamente os mecanismos moleculares de transmissão desses estímulos. A dor do tipo crônica, por exemplo, afeta quase um quinto dos habitantes no ocidente, constituindo um problema de saúde pública de grande relevância para o indivíduo e a sociedade. Embora vários estudos tenham elucidado determinadas vias de nocicepção, o grande desafio para a próxima década será, de fato, utilizar todo esse conhecimento para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos, mais eficazes e com menores efeitos adversos (McMAHON; BENNETT, 2007).

No entanto, apesar do nosso conhecimento acerca dos mecanismos de processamento e modulação da dor ter aumentado extensivamente ao longo das últimas décadas, as vias de transdução intracelulares e dos sistemas de percepção da dor permanecem, ainda, substancialmente incompletas. Além do mais, no que concerne a dor do tipo aguda e especialmente a dor crônica, ambas não estão totalmente elucidadas. Embora a indústria farmacêutica tenha feito expressivos investimentos para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos, ainda é preocupante a escassez dessa classe de drogas agindo em novos alvos moleculares (MOGIL; DAVIS; DERBYSHIRE, 2010).

Neste sentido inúmeros grupos de pesquisa em todo mundo têm voltado sua atenção para a validação do uso de plantas medicinais e do isolamento de seus metabólitos secundários, que podem vir a ser fonte de substâncias analgésicas mais potentes e com reduzidos efeitos colaterais, produzidas em menor tempo, a menores custos e, conseqüentemente, mais acessíveis à população (CALIXTO et al., 2000).

Portanto, na perspectiva de que as substâncias derivadas de produtos naturais, e/ou os seus derivados sintéticos, possam suprir tal necessidade, é indispensável que os mecanismos farmacológicos dessas substâncias sejam cada vez mais estudados.

### **1.1 Fundamentos do estudo da dor**

### 1.1.1 Classificação geral

A dor é uma sensação universal que nos acompanha desde os primórdios da nossa evolução, e desta forma, a grande maioria dos indivíduos já a vivenciaram de algum modo. Entretanto, torna-se difícil para alguém descrever a própria dor e, ainda, impossível de se conhecer exatamente a experiência dolorosa do outro. Isto porque a dor trata-se de uma experiência individual, com aspectos peculiares, associada às características únicas de cada organismo (RENTON , 2008).

Para melhor caracterizar o processo doloroso, pressupõe-se a existência de dois componentes envolvidos: um seria a sensação de dor propriamente dita e a outra seria chamada de nocicepção. A primeira descreve a reação emocional à dor, que corresponderia a uma interpretação afetiva a essa sensação, sendo esta de caráter individual, representada principalmente por experiências prévias, tais como a lembrança de alguma forma de sofrimento. A nocicepção, por sua vez, estaria mais relacionada à parte mecânica de transmissão da dor, induzida por estímulos nocivos exógenos, tais como biológicos, físicos e químicos, ou ainda, endogenamente principalmente por processos inflamatórios (MORAES; CAMARGO, 1999).

A dor pode ser de curta duração (aguda) ou mais prolongada (crônica). A dor aguda é geralmente benéfica para o indivíduo, servindo como advertência de dano tecidual real ou iminente, permitindo o seu rápido reflexo evasivo da fonte do estímulo nocivo. Esta dor nociceptiva surge na periferia através da ativação direta de nervos terminais sensitivos a dor, por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. A dor aguda pode ser geralmente aliviada pela administração local de agentes farmacológicos, por exemplo, os anestésicos locais ou anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), ou mesmo por agentes não-farmacológicos, como a aplicação de gelo sobre a área afetada. A dor crônica, por outro lado, tende a ser uma resposta não-adaptativa consequente de alguma patologia subjacente. A dor é considerada crônica se continuar duradoura por mais de três meses, em geral, e normalmente durar mais que a resposta de cura normal ou ainda continuar na ausência de qualquer dano tecidual observável (TURK; OKIFUJI, 2009). A dor crônica é a principal razão pela qual as pessoas buscam atenção médica, entretanto, o arsenal de medicamentos analgésicos disponíveis é limitado. Além

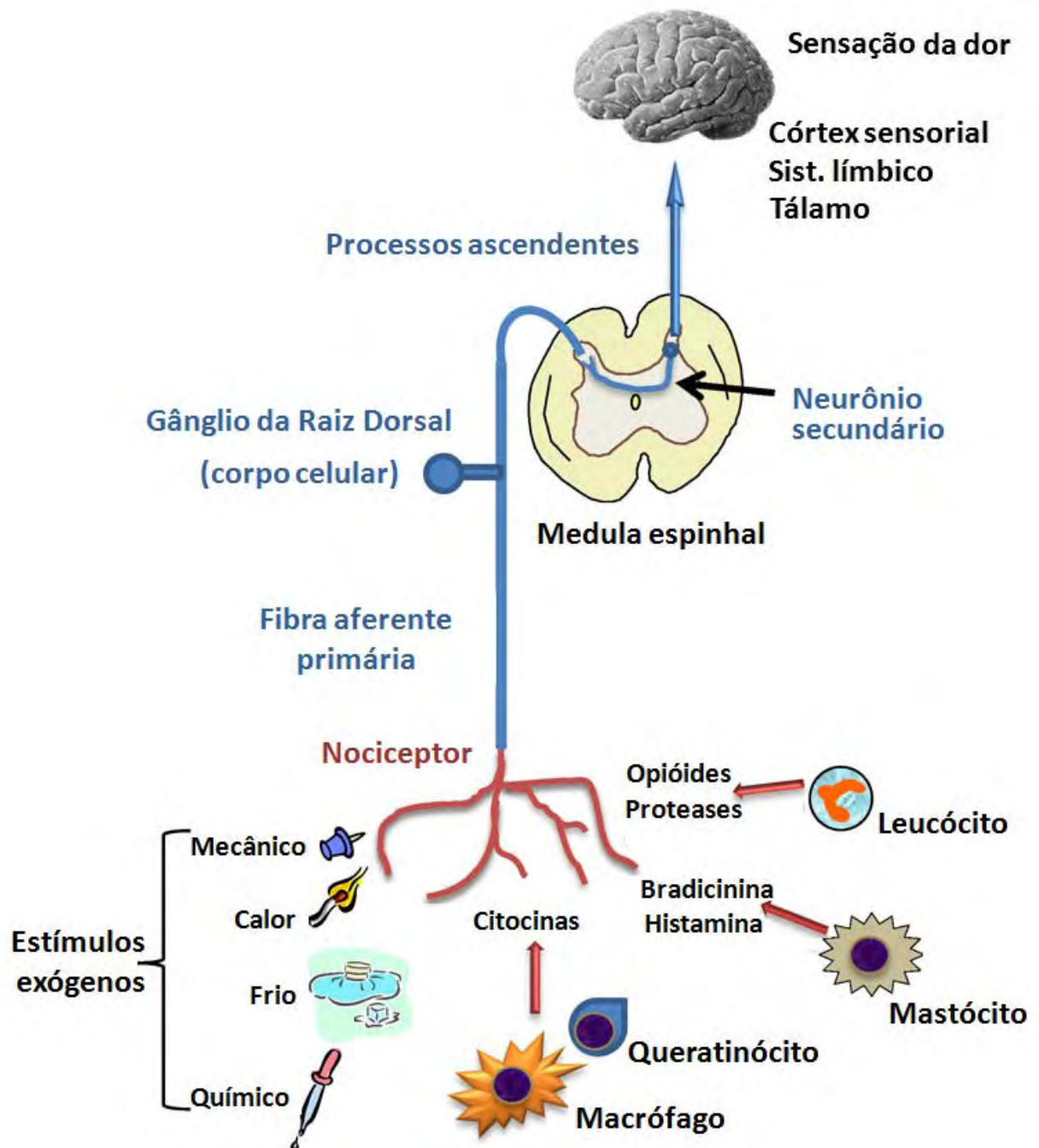
disso, todos os analgésicos atualmente disponíveis têm algum grau de efeito adverso associado, o que muitas vezes os tornam inadequados para certo tipo de paciente. Este é o tempo de desenvolver agentes analgésicos mais eficazes, seguros e com menores efeitos adversos (McDOUGALL, 2011).

Sob outro ponto de vista, a dor pode ser classificada considerando-se os mecanismos fisiológicos envolvidos, como dor nociceptiva, neuropática, referida ou visceral (SAKATA; GOZZANI, 1994; RENTON, 2008). De acordo com esta classificação, a dor nociceptiva é originada pela ativação dos nociceptores, bem localizada e circunscrita à área lesada, caracterizando-se por sensações claras e precisas. A dor neuropática caracteriza-se por um processo crônico associado apenas à via sensorial, e é decorrente de distúrbios do sistema nervoso central (SNC) ou por danos de nervos periféricos (DWORKIN, 2002). Contrariamente à dor nociceptiva, a dor referida não possui uma localização precisa, e ainda, pode ser decorrente de uma área do corpo não coincidente com a localização da víscera que a produziu (ARENDE-NEILSEN; SVENSSON, 2001). A dor visceral é a forma de dor que surge mais frequentemente como conseqüência de enfermidades, sendo o sintoma comum na maioria das síndromes dolorosas agudas e crônicas de interesse clínico. Esta caracteriza-se por ser vaga, mal localizada e se estende bem além do órgão lesado, podendo ser referida em regiões distantes da víscera que a originou (RENTON, 2008). O reconhecimento da dor como reação sensitiva envolve três mecanismos básicos: transdução, transmissão e modulação. Durante a transdução, ocorre a “transformação” de um estímulo mecânico, térmico ou químico, em uma ativação dos receptores da dor (nociceptores), que então o transmite na forma de um impulso nervoso por um potencial de ação. A modulação ocorre principalmente nos neurônios do trato espinotalâmico, os quais apresentam campos receptivos inibitórios da sensação dolorosa (RENTON, 2008).

### **1.1.2 Visão geral da transmissão da dor**

De acordo com uma visão geral clássica, a dor inicia-se na periferia por meio de um estímulo nocivo, que pode ser mecânico, físico ou químico, ativando terminações nervosas livres associadas com as fibras de pequeno diâmetro dos

neurônios aferentes (Figura 1). Este estímulo será posteriormente transmitido por meio de um sinal eletroquímico, o potencial de ação, que é transmitido da periferia para o SNC via os nervos aferentes primários de lenta duração.



**Figura 1 – As vias da nocicepção periférica.** Os estímulos nocivos externos ou internos podem ativar nociceptores periféricos que resultam na sensação de dor. Várias células situadas nas proximidades dos neurônios terminais podem liberar mediadores que podem aumentar ou reduzir o limiar de ativação do nervo. Adaptado de MacDougall (2011).

Ao inserirem-se no corno dorsal da medula espinhal, estes impulsos são transmitidos via sinapses químicas de neurônios de segunda ordem, os quais são posteriormente transportados ao longo de vias ascendentes para os centros superiores do cérebro. Por veicular esses impulsos para áreas específicas do cérebro, tais como o córtex somatosensorial e da amígdala, os sinais eletroquímicos tomam a forma de uma experiência psicofísica, incorporando as respostas para os reflexos motores e as respostas emocionais. É importante mencionar que os detalhes críticos de todo este processo ainda não foram totalmente esclarecidos (McDOUGALL, 2011).

Os neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) são responsáveis por intermediarem a transmissão dos sinais dolorosos da periferia à medula espinhal. O DRG está localizado na adjacência da medula espinhal, de onde as suas fibras nervosas são projetadas, interconectando o SNC com o sistema nervoso periférico (SNP). Essas fibras conectam-se com o corno dorsal da medula, através de distintas camadas, ou lâminas, separadas paralelamente, que consistem de uma combinação única de neurônios, podendo ser diferenciadas anatomicamente de I a V (Figura 2). Vários estudos demonstraram que as sensações mecânicas captadas pelos mecanorreceptores, são mediadas pelas fibras mielinizadas de grande calibre (Quadro 1), os quais conectam-se nas lâminas III, IV e V. Por sua vez, os estímulos dolorosos e os estímulos térmicos são transmitidos pelas fibras que se projetam nas lâminas superficiais I e II da medula espinhal (CASPARY; ANDERSON, 2003).

**Figura 2 – Os neurônios DRG e a transmissão sensorial.** Representação esquemática de como as fibras sensoriais, intermediadas pelo gânglio da raiz dorsal (DRG), se conectam às lâminas (I a V) localizadas no corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios nociceptivos, mecanoceptivos e propioceptivos estão mostrados, respectivamente, em vermelho, verde e azul. Em rosa estão os neurônios motores que se projetam diretamente à porção ventral da medula. Adaptado de Caspary e Anderson (2003).

Os estímulos dolorosos são captados pelos nociceptores, que são terminações nervosas livres das fibras mielínicas tipo A $\delta$  e das fibras amielínicas tipo C (Quadro 1), amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações e diferem dos demais por serem, normalmente, ativados por estímulos de intensidade nociva, capazes de causar certo grau de dano tecidual (McDOUGALL, 2011).

**Quadro 1 – Classificação das fibras nervosas.**

Tipo de Fibra	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Mielinização	Velocidade de Condução (m/s)	Função
A $\alpha$	12 – 20	Intensa	70 – 120	Motora, propiocepção
A $\beta$	6 – 12	Intensa	30 – 70	Tato, pressão
A $\gamma$	3 – 6	Intensa	15 – 30	Tônus muscular
A $\delta$	2 – 5	Intensa	3 – 15	Dor, toque, temperatura
B	< 3	Leve	3 – 15	Função autonômica
C	0,3 – 1,3	Ausente	0,7 – 2,3	Dor, toque, temperatura

### 1.1.3 As bases moleculares da nocicepção

Os receptores relacionados com a dor são descritos como “opióides” e são classificados em 4 tipos, nomeados com as letras gregas  $\mu$  (mü),  $\kappa$  (kappa),  $\delta$  (delta),  $\sigma$  (sigma), amplamente distribuídos no SNC, desempenhando diferentes efeitos farmacológicos (Quadro 2). Durante a ativação desses receptores, pelos agonistas opióides, ocorre o fechamento de canais para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), reduzindo a liberação de neurotransmissores. Além disso, a ativação de receptores  $\mu$  ou  $\delta$  promove a abertura de canais para potássio ( $\text{K}^+$ ) cálcio-dependentes ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), produzindo hiperpolarização da membrana celular e o fechamento dos canais  $\text{Ca}_v$ , o que reduz a liberação de substância P pelos terminais centrais do neurônio aferente primário. Estes agonistas atuam ainda ativando as vias inibitórias descendentes (MARTIN; EISENACH, 2001).

Dentre as classes mais estudadas, estão os receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , que são acoplados à proteína G e portanto capazes de afetar a regulação iônica, o processamento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e a fosforilação de proteínas. Foi sugerida a existência de diversos subtipos de receptores opióides; atualmente, os mais caracterizados por critérios farmacológicos incluem  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ,  $\delta_1$  e  $\delta_2$  (MARTIN; EISENACH, 2001). O quadro 2 descreve os efeitos farmacológicos dos principais tipos e subtipos de receptores opióides.

**Quadro 2 – Tipos de receptores opióides e seus efeitos farmacológicos.**

Tipo de Receptor	Efeitos Farmacológicos
<b>Mü (<math>\mu</math>)</b>	Analgesia espinhal ( $\mu_1$ ), analgesia supra-espinhal ( $\mu_2$ ), depressão respiratória ( $\mu_2$ ), constipação intestinal ( $\mu_2$ ), retenção urinária ( $\mu_2$ ), prurido ( $\mu_2$ ), sedação, euforia, dependência física.
<b>Kappa (<math>\kappa</math>)</b>	Analgesia espinhal ( $\kappa_3$ ), analgesia supra-espinhal ( $\kappa_2$ ), depressão respiratória, constipação intestinal, sedação.
<b>Delta (<math>\delta</math>)</b>	Analgesia espinhal, analgesia supra-espinhal ( $\delta_2$ ), depressão respiratória, prurido, dependência física.
<b>Sigma (<math>\sigma</math>)</b>	Retenção urinária, disforia, midríase.

Durante a nocicepção, além dos receptores opióides estão envolvidos ainda outros tipos de receptores, como os GABA<sub>A</sub> (PAN et al., 2008); M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>-muscarínicos (NAGUIB; YAKSH, 1997); NMDA-glutamatérgicos (CHIZH et al., 2001; CODERRE; VAN EMPLÉ, 1994); D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>-dopaminérgicos (PEANA et al., 2004). Sabe-se, ainda, que a liberação de mediadores químicos, tais como a bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandinas podem levar tanto à estimulação direta quanto à sensibilização dos receptores da dor (NICKEL et al., 2011).

O estudo da dor em nível molecular é um estudo complexo, pois vários receptores estão envolvidos neste processo e pouco ainda se sabe sobre suas bases moleculares e mecanismos de regulação. A dor neuropática, por exemplo, pode também estar associada a uma mudança na expressão gênica dos canais de sódio (Na<sup>+</sup>) dependentes de voltagem (Na<sub>v</sub>) após uma lesão no nervo, provocando uma hiperexcitabilidade nervosa (BLACK et al., 2004; DEVOR, 2006; WAXMAN et al., 2000). Dentre estes, os canais Na<sub>v1.7</sub>, Na<sub>v1.8</sub> e Na<sub>v1.9</sub>, são amplamente expressos em nervos periféricos e possuem relação direta com a dor (DIB-HAJJ et al., 2007; POYRAZ et al., 2003). Um outro tipo de canal iônico envolvido na nocicepção são os canais de K<sup>+</sup>, cuja ativação está envolvida na modulação positiva do efeito analgésico de agonistas opióides e muscarínicos (YAMAZUMI; OKUDA; KOGA, 2001). Dentre estes podem ser citados os canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>) como o K<sub>v4.2</sub> e o K<sub>v4.3</sub> (HUANG et al., 2005), e ainda, os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) (IWAMOTO; MARION, 1993) e ao cálcio (K<sub>Ca</sub>) (LI et al., 2007).

## **1.2 A excitabilidade neuronal e o potencial de ação composto (PAC)**

Os canais iônicos são poros hidrofílicos formados por proteínas integrais das membranas celulares das mais variadas espécies animais e vegetais. Eles possuem três importantes propriedades: conduzir íons, reconhecer e selecionar íons específicos, abrir e fechar em resposta a sinais elétricos, mecânicos ou químicos específicos. Os canais dos nervos e músculos conduzem os íons através da membrana celular a velocidades extremamente altas, cerca de 10<sup>6</sup> por segundo, o que causa alterações rápidas do potencial de membrana (HILLE, 2001).

Em todos os canais iônicos, as proteínas possuem diferentes estados conformacionais, dentre os quais, alguns apresentam maior estabilidade, o que corresponde a um estado funcional diferente. A transição do canal entre esses diferentes estados, é geralmente classificada em: aberto, fechado e inativado. Para que um estímulo cause a transição do estado conformacional de um canal, deve-se fornecer energia. No caso dos canais dependentes de voltagem, a energia é suprida pela movimentação de uma região carregada da proteína do canal, denominada sensor de voltagem, através do campo elétrico da membrana. O movimento das cargas do sensor de voltagem através do campo elétrico confere ao canal uma variação da energia livre, alterando seus estados fechado (C) e aberto (O). A transição entre estes dois estados requer em média, alguns milissegundos, todavia, quando iniciada, ela procede instantaneamente (cerca de 10  $\mu$ s) originando variações abruptas da corrente através do canal. Porém, apesar dessa rápida condução iônica, os canais iônicos são surpreendentemente seletivos, haja visto que cada tipo permite a passagem de apenas uma ou algumas espécies de íons (HILLE, 2001).

A ativação de diferentes classes de canais iônicos promove uma alteração rápida na polaridade da membrana das células excitáveis, através das correntes iônicas geradas, formando o potencial de ação que se propaga ao longo da célula, sendo considerado como a base da capacidade carreadora de sinais das células nervosas (ARMSTRONG; HILLE, 1998). Um potencial de ação é deflagrado quando ocorre um influxo de íons carregados positivamente na célula alterando a polaridade da membrana, carregada negativamente em sua porção interna durante o repouso para uma polaridade positiva, em um evento chamado de “despolarização”. A polaridade da membrana é restaurada pelo processo de “repolarização”, geralmente devido ao impedimento do influxo de íons positivos e ao efluxo de íons potássio ( $K^+$ ) por difusão, pela abertura dos canais  $K_v$  (ARMSTRONG; HILLE, 1998; HILLE, 2001).

O potencial de membrana das células nervosas em repouso é principalmente determinado por canais seletivos aos íons  $K^+$ , que são 100 vezes mais permeáveis ao  $K^+$  do que ao  $Na^+$ . Já durante o potencial de ação, são ativados canais de 10 a 20 vezes mais permeáveis ao  $Na^+$  do que ao  $K^+$ . Logo, a chave para a grande versatilidade da sinalização neuronal está na ativação de diferentes classes de canais iônicos (HILLE, 2001; YU; CATTERALL, 2007).

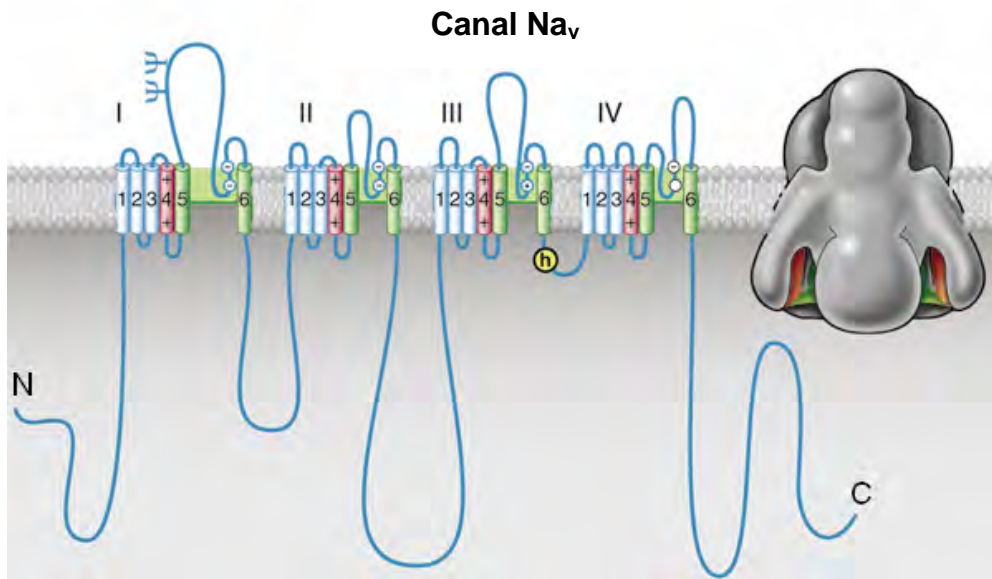
A soma algébrica de vários potenciais de ação, resultantes da estimulação de vários axônios presentes em uma fibra nervosa, é chamada de potencial de ação composto (PAC), o qual foi descrito, inicialmente, a partir do primeiro pico (A) gerado em um nervo e as suas subdivisões ( $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\gamma$  e  $A\delta$ ) como a soma da atividade elétrica das fibras mielínicas de rápida condutância (PERL, 2007). Um pico de condutância muito lenta também observado foi proposto como a representação da atividade das fibras amielínicas do tipo C. Diferentemente do potencial de ação gerado em um único axônio, o PAC é uma resposta graduada, cuja magnitude aumenta com a intensidade do estímulo. Isso ocorre devido ao fato de que diferentes axônios presentes na fibra nervosa possuem diferentes limiares de excitabilidade e diferentes diâmetros, sendo mais rápidas e excitáveis as fibras que possuem menor limiar e maior diâmetro (Quadro 1), de acordo com a seguinte ordem:  $A\alpha > A\beta > A\gamma > A\delta > B > C$  (PERL, 2007).

### 1.2.1 Os canais de $\text{Na}^+$ dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ )

Os canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) são as bases da excitabilidade elétrica do nervo e das células musculares (CRUZ et al., 2000). O canal para  $\text{Na}^+$  foi purificado pela primeira vez do órgão elétrico do peixe *Electrophorus electricus*, sendo composto por uma única cadeia peptídica de 260 kD (AGNEW et al., 1980). Ao todo, existem dez genes para as subunidades  $\alpha$  dos canais  $\text{Na}_v$  no genoma humano, e nove deles pertencem a uma única família com identidade superior a 70% da sua seqüência de aminoácidos (GOLDIN et al., 2000).

Drogas que bloqueiam os canais  $\text{Na}_v$  são utilizadas para o tratamento da dor, arritmias cardíacas, analgesia e epilepsia. Estes canais são expressos em diferentes tipos de células excitáveis e conduzem os íons  $\text{Na}^+$  dez vezes mais rápido que o  $\text{K}^+$  ou o  $\text{Ca}^{2+}$ . A sua seletividade é determinada pelas cadeias laterais de quatro resíduos de aminoácidos (aspartato-glutamato-lisina-alanina), entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio (Figura 3), os quais são conservados em todos os dez canais (SUN et al., 1997). Após um curto período (1 a 2 ms) após aberto, os canais  $\text{Na}_v$  são inativados através do *gating* de inativação citoplasmático formado pelo motivo hidrofóbico IFMT (isoleucina-fenilalanina-metionina-treonina), localizado

na porção interna do canal e entre os domínios III e IV (Figura 3) (ROHL et al., 1999). A inativação exerce um controle crucial na condutância dos canais  $\text{Na}_v$ , permitindo que o canal abra em rápidas seqüências para gerar os trens de sinais elétricos breves (YU; CATTERALL, 2004).



**Figura 3 – O canal para  $\text{Na}^+$  dependente de voltagem.** Representação esquemática da subunidade  $\alpha$  do canal para  $\text{Na}^+$  dependente de voltagem ( $\text{Na}_v$ ). À esquerda, estão representados os seus quatro domínios (I-IV), formados por seis segmentos transmembrana (S1–S6). Entre os segmentos S5 e S6 ocorre a região formadora do poro (verde). Em vermelho, os segmentos S4 carregados positivamente e em amarelo, o *gating* de inativação (motivo IFMT). Os círculos entre os *loops* representam os aminoácidos que formam o filtro de seletividade ao íon. N e C representam as porções amino e carboxi-terminais, respectivamente. À direita, está representada a estrutura tridimensional da subunidade  $\alpha$  (20 Å). Adaptado de Yu e Catterall (2004).

### 1.3 Os canais receptores de potencial transiente (TRP)

Com o advento da tecnologia de clonagem molecular, identificou-se um grande número de canais para cátions, pertencentes à grande família dos canais receptores de potencial transiente (TRP). A identificação desses canais iônicos em nociceptores polimodais, ativados por diferentes tipos de estímulo, despertou o intenso interesse dos pesquisadores, muitos dos quais consideram os canais TRP

os principais integrantes da modulação e transdução da dor. De fato, os canais TRP estão associados com todos os aspectos da fisiologia sensorial, incluindo as sensações mecânicas e térmicas, visão, audição e paladar. Fica evidente, portanto, o motivo pelo qual esses canais têm motivado grande interesse por parte da comunidade científica e inclusive da indústria farmacêutica (McDOUGALL, 2011).

A subfamília de canais TRP sensíveis à temperatura (Termo-TRP) possui duas grandes subdivisões de canais, aqueles sensíveis ao calor e os sensíveis ao frio (REID, 2005). O canal TRPV1 (CATERINA et al., 1997) é considerado o arquétipo dos Termo-TRP, entretanto o grupo também inclui o TRPV2 (CATERINA et al., 1999), TRPV3 (SMITH et al., 2002) e TRPV4 (GULER et al., 2002). Os canais TRPM2 (SANO et al., 2001), TRPM4 (XU et al., 2001) e TRPM5 (TALAVERA et al., 2005) foram recentemente relatados por serem também modulados por temperaturas elevadas, entretanto os seus papéis na regulação da sensação térmica permanecem desconhecidos. Dentre os Termo-TRP sensíveis ao frio, incluem TRPM8 e TRPA1 (McKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; PEIER et al., 2002; STORY et al., 2003).

Esses canais são descritos por possuírem seis domínios transmembranares, cujas terminações carboxi e amino-terminais estão localizadas na porção citoplasmática, e a região formadora do poro localizada entre os segmentos 5 e 6 (Figura 4). Na porção amino-terminal localizam-se as repetições das sequências da anquirina, as quais variam entre os vários tipos de Termo-TRPs (SZALLASI et al., 2007).

Até a presente data, a subfamília TRPV é composta por um total de seis membros, do TRPV1 ao TRPV6, dos quais os TRPV1 ao TRPV4 são foco de maior interesse como alvos potenciais para novas drogas analgésicas. Os outros dois canais, TRPV5 e TRPV6, parecem ser constitutivamente ativos e, ainda, desempenham um importante papel na recaptação da vitamina D, dependente de cálcio nos rins e intestino, respectivamente (GRAAF; HOENDEROP; BINDELS, 2006).

**Figura 4 – Estrutura molecular dos canais Termo-TRP envolvidos na nocicepção e a sua ativação por compostos de origem natural.** Esses canais possuem seis domínios transmembranares, cuja região formadora do poro localiza-se entre os domínios 5 e 6. As porções carboxi e amino-terminais localizam-se intracelularmente, sendo nesta última encontradas as repetições de anquirina (barra marron). Exemplos de compostos derivados de produtos naturais ativadores desses canais: A) Capsaicina (*Capsicum sp.*), B e C) Cânfora (*Cinnamomum camphora*); D) Bisandrografolida (*Andrographis paniculata*); E) Mentol (*Mentha sp.*); F) Cinamaldeído (*Cinnamomum sp.*) G) Isotiocianatos (*Armoracia rusticana*); H) Alicina (*Allium sp.*). Adaptado de Szallasi e col. (2007).

Outro canal TRPV cuja atenção tem sido creditada de maneira cada vez mais frequentes é o canal do tipo 4 (TRPV4). Este canal é expresso em terminações nervosas sensoriais livres (SUZUKI et al., 2003) e é conhecido por ser ativado por temperaturas moderadas (25-34 °C), por estímulos mecânicos (MUTAI; HELLER, 2003), e ligantes químicos, tais como o 4- $\alpha$ -forbol-12,13-didecanoato (4 $\alpha$ -PDD) e pelos ácidos epóxi-eicosatrienóicos (VRIENS et al., 2005; WATANABE et al., 2003). A identificação de canais TRPV4 nas células ciliadas da cóclea e nas células de Merkel, e posteriormente identificados nas fibras sensitivas do tipo A $\delta$  e C da pele de rato, forneceram a indicação de que esses canais estariam envolvidos na mecano-sensibilidade e na nocicepção decorrente de estímulos mecânicos (LIEDTKE ET AL., 2000; SUZUKI ET AL., 2003). De fato, demonstrou-se que camundongos

“knockout” para o canal TRPV4 possuíam um maior limiar para estímulos mecânicos nocivos em relação ao tipo selvagem desses animais (SUZUKI et al., 2003).

Dentre os canais TRP, o primeiro demonstrado a responder quando em baixas temperaturas foi o TRPA1, assim chamado após ter sido encontrado em nociceptores polimodais, de estrutura semelhante ao TRPV1, entretanto, apresentando grande número de motivos repetitivos de anquirina (JAQUEMAR, SCHENKER, TRUEB, 1999; STORY et al., 2003). Os canais TRPA1 ativados por temperaturas moderadas, em torno de 17 °C (Quadro 3), e demonstrou-se que a sua expressão era aumentada em neurônios DRG após a indução de inflamação ou lesão neuronal (KATSURA ET AL., 2006; FREDERICK et al., 2007).

Outro canal TRP conhecido por estar envolvido na sensação de frio pertence à família dos receptores da melastatina, e por isso denominado como TRPM8 (MCKEMY, NEUHAUSSER, JULIUS, 2002; PEIER et al., 2002). Ativado por faixas de temperaturas de 18-24 °C (Quadro 3), bem como por compostos refrescantes, tais como o mentol, eucaliptol e icilina, os canais TRPM8 são expressos por cerca de 15% dos neurônios DRG de pequeno diâmetro e de neurônios trigeminais (BAUTISTA et al., 2007; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Por ser um canal de cátions não-seletivo, a estimulação dos canais TRPM8 promove a despolarização da membrana e a deflagração de impulsos nervosos aferentes. Em vários modelos de dor neuropática e inflamatória, a expressão de canais TRPM8 é aumentada bem como a hipersensibilidade do canal aos estímulos térmicos e mecânicos, embora ainda não esteja claro se este isto seria resultante de ativação ou bloqueio do TRPM8 (FREDERICK et al., 2007; PROUDFOOT et al., 2006; XING et al., 2007). Portanto, vários estudos têm demonstrado a importância dos canais TRPM8 durante o desenvolvimento da dor crônica resultante de inflamação ou da dor do tipo neuropática, e que a intervenção farmacológica sobre esses receptores poderia gerar novas estratégias para o combate dessas doenças (PROUDFOOT et al., 2006).

**Quadro 3 – Os canais Termo-TRP envolvidos na dor e os seus respectivos ativadores e bloqueadores.**

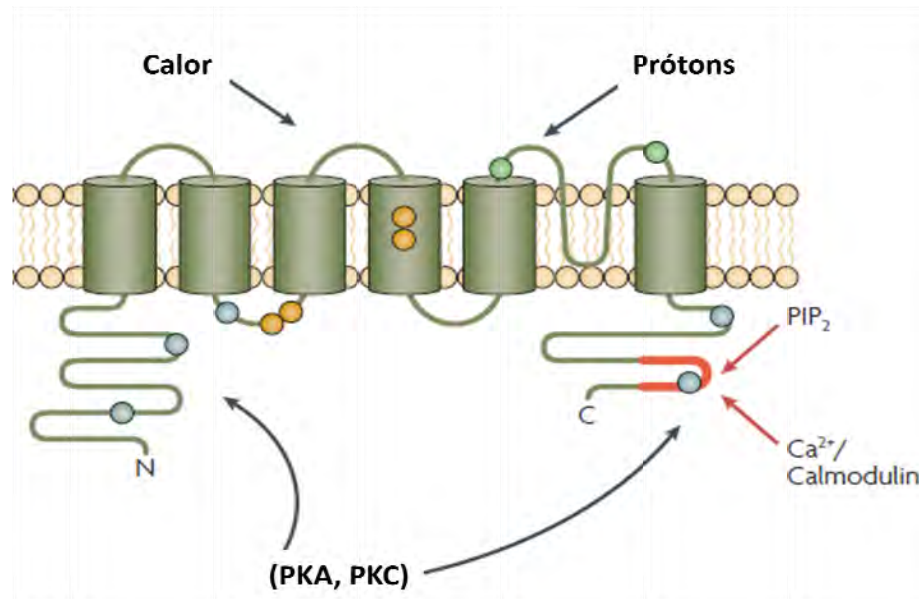
Canal TRP	Ativador	Sensibilidade térmica	Bloqueador seletivo
TRPV1	Prótons	43–52 °C	SB366791
	Vanilóides		Capsazepina
	Etanol		
TRPV2	$\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol	$\geq$ 52 °C	Nenhum
	2-aminoetoxidifenil borato		
	Distensão mecânica		
TRPV3	Eugenol	32–39 °C	Nenhum
	2-aminoetoxidifenil borato		
	Vanilina		
	Cânfora		
TRPV4	4 $\alpha$ -Forbol 12,13-didecanoato	25–34 °C	HC-067047
			RN-1734
	Ácido epóxi-eicosatrienóicos		
	Mecânico		
TRPA1	Cinamaldeído	17 °C	AP18
	Alicina		HC-030031
	Acroleína		
	Formalina		
	Óleo mostarda		
TRPM8	Mentol	18–24 °C	5-benziloxitriptamina
	Eucaliptol		
	Hortelã		
	Icilina		

### 1.3.1 O canal TRPV1 e a nocicepção

Dentre os canais TRP que receberam maior atenção, incluem-se os canais pertencentes à subfamília dos receptores da vanilina, os vanilóides, em particular o do tipo 1 (TRPV1). Este canal foi clonado inicialmente em 1997 (CATERINA et al., 1997), pela equipe do Dr. David Julius, e é conhecido por ser sensível a capsaicina, a prótons, a temperaturas superiores a 42°C (Quadro3), aos endovanilóides, aos canabinóides, e a uma série de mediadores inflamatórios. A natureza “promíscua” do canal TRPV1 o torna um modulador crucial dos estímulos nociceptivos provenientes de diversas modalidades sensoriais. Conseqüentemente, os antagonistas TRPV1 estão sendo constantemente investigados como potenciais candidatos analgésicos (McDOUGALL, 2011).

De acordo com estudos recentes descrevendo a estrutura do canal TRPV1 (Figura 5), demonstrou-se que os sítios de ligação dos vanilóides estariam situados entre as regiões transmembranares 3 e 4 (Y511, S512, L547, T550), localizados na porção intracelular do canal (JORDT; JULIUS, 2002; JOHNSON et al., 2006). Extracelularmente, alguns aminoácidos localizados perto do domínio da região formadora do poro (D5 e D6) têm sido implicados na sensibilidade ao pH por TRPV1 (TOUSOVA et al., 2005). Recentemente, tem sido demonstrado que é no domínio carboxi-terminal de TRPV1 que está localizado o sítio que confere sensibilidade ao calor por esses canais (BRAUCHI et al., 2006).

Na porção amino-terminal do canal TRPV1 estão localizados os sítios de fosforilação (S116, T370, S502, T704 e S800), modulados pela proteína kinase A (PKA) ou C (PKC) (Figura 5), que por sua vez podem modular esses canais, aumentando a sua sensibilização (PREMKUMAR; AHERN, 2000; NUMAZAKI et al., 2002). Em contrapartida, a desfosforilação desses sítios por fosfatases promovem a dessensibilização de TRPV1. Portanto, além da sua sensibilização, o canal TRPV1 também exhibe uma dessensibilização do tipo agonista-induzida e que deve ser distinguida da completa desfuncionalização do neurônio por outros agonistas TRPV1 (SZOLCSÁNYI, 2006).



**Figura 5 – Representação estrutural do canal TRPV1 e seus sítios de modulação.** As setas em azul e vermelho indicam, respectivamente, os locais de regulação positiva e negativa do canal TRPV1. Os círculos nas cores azul, laranja e verde, representam os sítios de ativação por fosforilação (S116, T370, S502, T704, S800), compostos valinóides (Y511, S512, L547, T550) e baixo-pH (E600, E646), respectivamente. A linha vermelha representa o domínio carbóxi-terminal de TRPV1, onde ocorre a interação pelo fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) e por Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. Adaptado de Szallasi e col. (2007).

#### 1.4 O controle farmacológico da dor

O tratamento da dor pode ser efetuado por diferentes classes de substâncias, dentre as quais destacam-se os antiinflamatórios, os opióides, antidepressivos, anticonvulsivantes, neurolépticos e ansiolíticos.

Os analgésicos da classe dos antiinflamatórios diminuem a produção de prostaglandinas e leucotrienos que sensibilizam os receptores da dor para a ação de substâncias liberadas durante a lesão. Os vários agentes desta classe diferem entre si quanto à potência antiinflamatória, cinética e efeitos colaterais. Embora não causem dependência psíquica, podem provocar alterações gástricas, hepáticas e renais, reações alérgicas e alterações hematológicas (HARRIS; BREYER, 2006; MUNIR; ENANY; ZHANG, 2007).

Os analgésicos opióides, cujo principal representante é a morfina, agem através da ligação aos receptores no SNC e SNP, inibindo a transmissão da dor. São úteis no tratamento das dores oncológicas e traumáticas, no entanto seus

inúmeros efeitos colaterais e o risco de dependência os tornam fatores limitantes para fins terapêuticos (BALLANTYNE, 2007; MARTIN; EISENACH, 2001).

A ação analgésica dos antidepressivos é atribuída, principalmente, ao bloqueio da recaptação de serotonina e noradrenalina pelas vias supressoras da dor. Estas drogas elevam também os níveis sinápticos de dopamina e alteram a atividade de alguns neurotransmissores, como a substância P e o GABA (ácido- $\gamma$ -aminobutírico). Já os anticonvulsivantes, promovem estabilização das membranas neuronais das vias aferentes da dor, com diminuição da transmissão sináptica e supressão da atividade espontânea que ocorre em certas síndromes dolorosas (JANN; SLADE, 2007; JOHANNESSEN LANDMARK, 2008; PAN et al., 2008).

Os neurolépticos ativam mecanismos de modulação da dor e diminuem a excitabilidade neuronal proporcionando sedação e analgesia, enquanto que os ansiolíticos atuam reduzindo a ansiedade, a insônia e também promovendo relaxamento muscular (SAKATA; GOZZANI, 1994).

Os agentes analgésicos mais eficazes e que são utilizados atualmente foram desenvolvidos na tentativa de combater a dor nos níveis centrais e/ou periféricos relacionados com a trajetória do processo nociceptivo. Uma vez que os analgésicos de ação central tendem a produzir inúmeros efeitos colaterais indesejados, como exemplo a disforia, o déficit motor e a dependência, as drogas de ação periférica têm a vantagem de contornar esses problemas diretamente na fonte do estímulo (McDOUGALL, 2011).

## **1.5 Produtos naturais e sintéticos bioativos**

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus metabólitos secundários tais como flavonóides, alcalóides, terpenos, taninos e lignanas tem sido objeto de incessantes estudos, e muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de aproveitamento como futuros fármacos.

Vários são os exemplos históricos do emprego de plantas medicinais na obtenção e estudo de novas substâncias com ação no SNC, tais como a morfina e a codeína, obtidas a partir da *Papaver somniferum* que promovem analgesia e alterações no humor, por atuar principalmente nos receptores  $\mu$ -opióides (HUANG; KUTCHAN, 2000).

De acordo com as suas propriedades químicas, os produtos naturais possuem geralmente uma composição molecular distinta dos fármacos sintéticos, contendo pouco nitrogênio, halogênio e enxofre, porém ricos em oxigênio (ORTHOLAND; GANESAN, 2004). Além disso, tais compostos apresentam comumente mais sistemas de anéis e maior grau de insaturação, resultando numa estrutura estericamente restrita que confere à molécula maior força de ligação, devido a uma menor perda entrópica (PHILLIPSON, 2001).

A etnofarmacologia associada à descoberta de novas drogas, usando produtos naturais, permanece um assunto de grande importância no cenário mundial (PATWARDHAN; VAIDYA; CHORGHAE, 2004). Muitas drogas modernas têm suas origens na etnofarmacologia. Entretanto, apesar do avanço tecnológico atual, o processo de descoberta de novas drogas que possam ser úteis na terapêutica é considerado o principal déficit que, adversamente, afeta a indústria farmacêutica (PATWARDHAN, 2005).

Algumas espécies vegetais do Nordeste brasileiro, com ampla distribuição na Paraíba, têm mostrado resultados muito promissores com atividade no SNC, como a *Dioclea grandiflora* com potencial efeito antinociceptivo (ALMEIDA et al., 2000) e anticonvulsivante (ALMEIDA et al., 2011), *Cissampelos sympodialis* indicado para o tratamento de problemas respiratórios e com um perfil antidepressivo em testes preliminares (MAIOR et al., 2003).

Há, portanto, uma demanda cada vez maior por estudos visando a obtenção de outros compostos terapeuticamente viáveis. Neste contexto incluem-se as drogas que atuam sobre o SNC e o SNP. Esses medicamentos têm valor inestimável, já que podem produzir efeitos que alteram a fisiologia e psique, aliviando a dor ou a febre, suprimindo distúrbios do movimento, evitando convulsões e induzindo o sono. Podem ainda tratar da ansiedade, depressão ou esquizofrenia sem alterar a consciência.

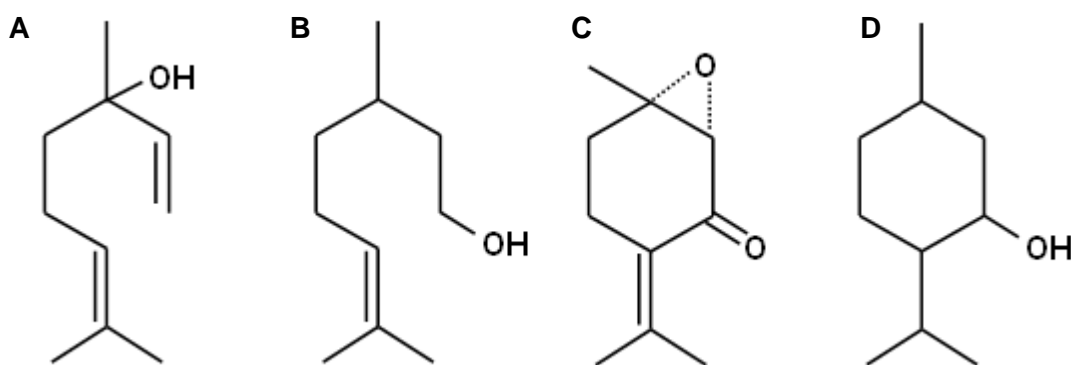
### **1.5.1 Os óleos essenciais e seus constituintes**

Os óleos essenciais (OE's) constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas aromáticas, e assim são denominados devido à composição lipofílica que possuem, quimicamente diferentes da composição

glicerídica dos óleos e gorduras (SIANI et al., 2000). Muitos desses óleos já possuem diversos estudos relatando suas inúmeras atividades biológicas sobre o sistema nervoso, tais como analgésica (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001), anticonvulsivante (ALMEIDA et al., 2011) e ansiolítica (ALMEIDA et al., 2004; UMEZU et al., 2002).

Com relação à natureza química dos OE's, esses, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta, principalmente, substâncias constituídas por dez e por quinze átomos de carbono, conhecidas como monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente (ALMEIDA et al., 2011; SIANI et al., 2000).

Os efeitos dos OE's são provavelmente devido aos monoterpenos, considerados como os seus principais constituintes. Essa informação é baseada no fato de que vários monoterpenos presentes nesses óleos apresentaram diferentes atividades no SNC e SNP, como exemplo o linalol e o citronelol que possuem atividade anticonvulsivante (DE SOUSA et al., 2006; ELISABETSKY et al., 1995), e o mentol e a rotundifolona com propriedades analgésicas (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996; GALEOTTI et al., 2002) (Figura 6).



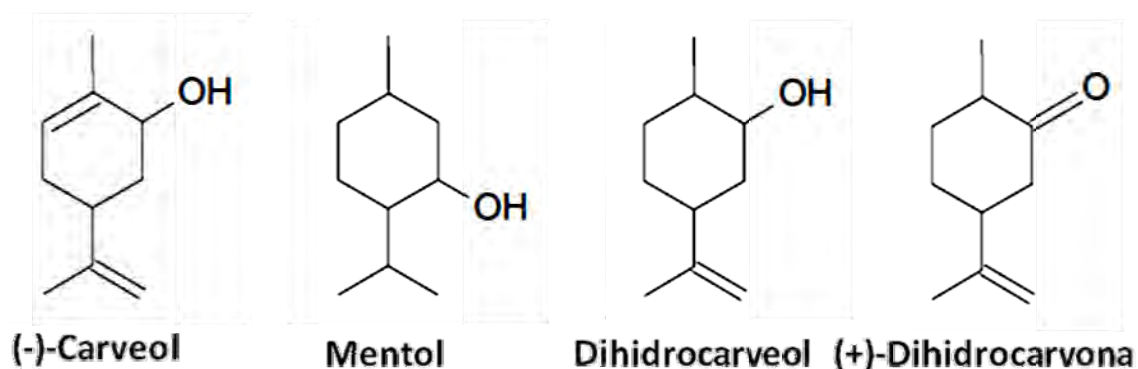
**Figura 6 – Exemplos de monoterpenos biologicamente ativos.**

A. Linalol; B. Citronelol; C. Rotundifolona; D. Mentol.

Recentemente, um estudo com monoterpenos alcoólicos e cetônicos demonstrou que os efeitos produzidos por estes compostos foram dependentes de

suas estruturas e grupos funcionais associados ( $-OH$  ou  $=O$ ) e o tipo de receptor estudado (HALL et al., 2004).

Recentemente, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de se investigar o efeito de monoterpenos sobre os canais TRP. De fato, Calixto e col. (2005) revelaram a grande contribuição dos compostos derivados produtos naturais, como a capsaicina, resinferatoxina e o mentol, para uma melhor compreensão dos canais TRP e de suas funções. A cânfora é outro exemplo de monoterpeno que atua sobre os canais TRP, mais precisamente os da subfamília dos receptores valinóides TRPV1 e TRPV3 (MOQRICH et al., 2005). E baseando-se nesses dados, Vogt-Eisele e col. (2007), realizaram um interessante estudo estrutura-atividade com uma série de compostos naturais sobre os canais TRPV3, sendo a maioria destes monoterpenos, e em seguida demonstrou que pelo menos seis deles eram mais potentes que a cânfora. Dentre estes estavam a carvacrol,  $(-)$ -carveol, timol, dihidrocarveol,  $(+)$ -borneol e o 6-tert-butil-m-cresol. Foi constatado que todos esses compostos possuíam um grupo hidroxil ligado ao anel, alifático ou aromático, de suas moléculas (VOGT-EISELE et al., 2007). Em comum, alguns desses monoterpenos (Figura 7) possuem semelhança estrutural com a  $(-)$ -carvona, um outro exemplo de monoterpeno biologicamente ativo.



**Figura 7 – Monoterpenos com ação sobre canais TRP.**

## 1.6 Propriedades químicas e biológicas de (-)-carvona

A carvona (*p*-menta-6,8-dieno-2-ona) é um monoterpreno cetônico representante da classe dos terpenos, que é encontrado como o principal constituinte ativo dos OE's de algumas espécies vegetais do gênero *Mentha* e comumente extraída a partir de suas folhas (YOUNIS; BESHIR, 2004). Dentre os seus enantiômeros (Figura 8), a R-(-)-carvona ((-)-carvona), é majoritária do óleo da hortelã-peluda (*Mentha spicata*), enquanto que a S-(+)-carvona ((+)-carvona) é o principal componente dos óleos da alcaravia (*Carum carvi*) e do endro (*Anethum graveolens*) (DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007).

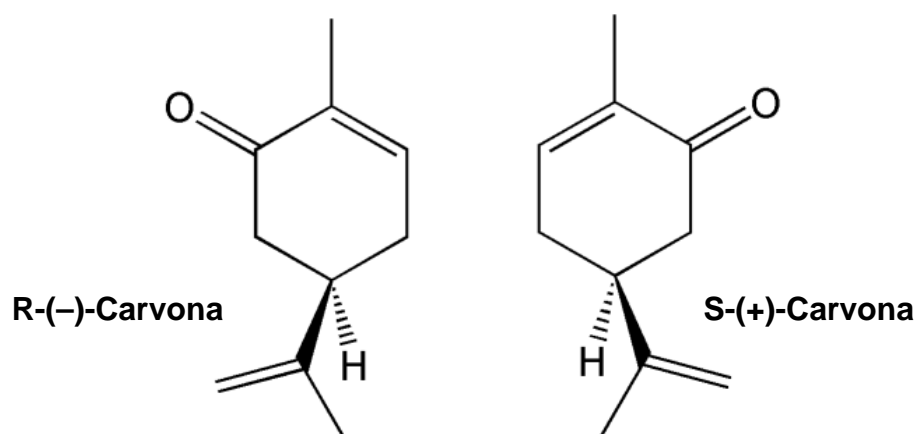


Figura 8 – Estrutura química dos enantiômeros de carvona.

Embora ainda existam poucos estudos científicos demonstrando os efeitos da carvona sobre o sistema nervoso, recentemente alguns trabalhos têm demonstrado uma busca crescente de informações acerca da farmacologia deste composto. A exemplo, um estudo realizado por Mora et al. (2005), sugeriu que tanto a carvona quanto a tujona, ambos compostos presentes no extrato hidroalcoólico de *Aloysia polystachya* (griseb.) moldenke (*Verbenaceae*), poderiam ser os responsáveis pela atividade sedativa, ansiolítica e antidepressante induzidas em ratos por este extrato. Buchbauer et al. (2005), demonstraram os efeitos sedativos dos isômeros de carvona sobre a atividade locomotora de camundongos, após a inalação destes compostos.

Estudos relativos à toxicidade da carvona evidenciaram que o enantiômero (-)-carvona possui uma toxicidade ligeiramente maior que a (+)-carvona, os quais possuem DL<sub>50</sub> de 426,6 (389,0–478,6) mg/kg e de 484,2 (358,9–653,2) mg/kg respectivamente. No mesmo estudo foi demonstrado que a (+)-carvona apresentou atividade anticonvulsivante, enquanto que a (-)-carvona demonstrou uma provável atividade antinociceptiva (DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007).

Trabalhos referentes aos mecanismos da olfação confirmaram que os enantiômeros de carvona afetam a atividade da enzima adenilato ciclase (SKLARS et al., 1986). Adicionalmente, Breer (1991) indicou que quando a concanavalina A, uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis*, era aplicada sob o epitélio olfatório de sapos, bloqueava-se a transdução de cAMP induzida por (+)-carvona, mas não para (-)-carvona. Fato este, que mais tarde revelou-se ocorrer devido a existência de populações neuronais diferentemente ativadas (KIRNER et al., 2003), sugerindo-se, portanto, diferentes receptores para os enantiômeros de carvona.

Outro importante estudo demonstrou que a (+)-carvona produziu oscilações de freqüências semelhantes tanto no epitélio olfatório (SNP) quanto no bulbo olfatório (SNC). Estímulos estes que foram continuados mesmo após a secção do nervo olfatório, indicando que as oscilações no epitélio olfatório provocadas por (+)-carvona possuem uma fonte nervosa periférica (DORRIES; KAUER, 2000). Ainda, estudos em humanos realizados por Heuberger et al. (2001) demonstraram que a inalação de (-)- e (+)-carvona, por voluntários sadios, foi capaz de provocar alterações na pressão sanguínea sistólica e diastólica, provavelmente decorrentes de uma atividade sobre o sistema nervoso autônomo.

Também foi relatado um estudo que avaliou a atividade de monoterpenos alcoólicos e cetônicos, sobre receptores para o GABA e para a glicina expressos em *Xenopus oocytes*, demonstrando que os isômeros de carvona e mentona, ambos cetônicos, produziram efeitos ínfimos sobre receptores GABA<sub>A</sub> e glicina, quando comparados com monoterpenos alcoólicos como o mentol (HALL et al., 2004).

Estudos acerca da atividade antinociceptiva de alguns monoterpenos, indicaram que tanto a rotundifolona, quanto a hidroxidihidrocarvona e a epóxi-carvona, apresentaram um potencial analgésico em camundongos (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996; DE SOUSA et al., 2007a, 2007b; DE SOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007; DE SOUSA; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006; OLIVEIRA,

2006). Em comum, estes três monoterpenos possuem grande semelhança estrutural com a (-)-carvona, sendo a hidroxidihidrocarvona e a epóxi-carvona seus derivados sintéticos.

Em um estudo realizado recentemente, demonstrou-se que (-)-carvona de fato possui atividade antinociceptiva marcante, ao avaliar os efeitos desse monoterpeno durante testes comportamentais específicos para dor, realizados em camundongos, como o teste da formalina e do ácido acético (GONÇALVES et al., 2008). Entretanto, tal efeito não fora observado pelo teste da placa-quente e nem mesmo bloqueado pela naloxona, um clássico antagonista opióide, revelando que este monoterpeno atue via SNP (GONÇALVES, 2008). De fato, (-)-carvona bloqueou a excitabilidade periférica de modo dependente de sua concentração, sugerindo-se que o seu efeito antinociceptivo está relacionado com a via de analgesia periférica, entretanto, o seu mecanismo farmacológico ainda permanece desconhecido (GONÇALVES et al., 2008).

Apesar de vários monoterpenos terem sido descritos por atuarem em canais TRP, inclusive alguns destes serem análogos estruturais de (-)-carvona como o carvacrol, (-)-carveol, timol ou mentol, até o presente momento, nenhum estudo demonstrou o envolvimento de canais TRP durante os efeitos analgésicos de (-)-carvona (ARAÚJO et al., 2011).

De fato, (-)-carvona apresentou baixa atividade sobre canais TRPV3, expressos heterologamente em *Xenopus oocytes* (VOGT-EISELE et al., 2007), entretanto, um efeito mais seletivo e marcante sobre outros tipos de canais TRP envolvidos na nocicepção ainda não foram descritos.

Portanto, o presente trabalho propõe dar continuidade ao estudo dos mecanismos responsáveis pelo efeito antinociceptivo periférico de (-)-carvona (GONÇALVES et al., 2008), na perspectiva de melhor esclarecer o envolvimento

# Objetivos

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Determinar o mecanismo de ação pelo qual (-)-carvona promove seu efeito antinociceptivo periférico.

### 2.2 Específicos

- Determinar a citotoxicidade de (-)-carvona em neurônios DRG e na linhagem HEK 293;
- Realizar um estudo estrutura-atividade da (-)-carvona e seus análogos sobre o bloqueio da excitabilidade periférica;
- Avaliar o efeito de (-)-carvona sobre canais de sódio dependentes de voltagem de neurônios DRG;
- Investigar a influência de (-)-carvona sobre os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares de neurônios DRG;
- Determinar os receptores envolvidos durante o efeito de (-)-carvona sobre neurônios DRG;
- Avaliar o efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2 estavelmente expressos em células T-Rex;
- Investigar o efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 heterologicamente expressos em células HEK 293;
- Propor um mecanismo de ação através do qual a (-)-carvona promove o seu efeito antinociceptivo.

# Material e Métodos

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) albinos da linhagem *Wistar*. Os animais foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George (CBiotec/UFPB). Os mesmos foram mantidos em gaiolas de polietileno, sob condições monitoradas de temperatura ( $21 \pm 1$  °C) e com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo *pellets* (Purina/Brasil) e água livremente disponível.

Todos os modelos experimentais realizados com estes animais durante este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/LTF), sob o processo de número 306/08 (Anexo).

#### 3.2 Sais e reagentes

Os sais e reagentes utilizados no presente estudo foram: cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), cloreto de sódio (NaCl), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), fluoreto de cério ( $\text{CsF}$ ), fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaHPO}_4$ ), hidróxido de cério (CsOH). Estes foram adquiridos do laboratório Vetec (Brasil) ou da Sigma-Aldrich (EUA).

O ácido etileno glicol tetracético (EGTA), ácido n-(p-amilcinamoil) antranílico (ACA), ácido-n-[2-hidroxietil]-piperazina-n'-[2-etanosulfônico] (HEPES), capsaicina, capsazepina, cloreto de colina (Cho-Cl), cloreto de tetra-etil-amônio (TEA-Cl), doxorubicina, dimetilsulfóxido (DMSO), cafeína, D-glicose, hidrato de doxiciclina, iodeto de propídio, ionomicina, laminina, maleato de dizocilpina (MK-801), poli-L-lisina, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), vermelho de rutênio e tapsigargina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

As enzimas papaína e collagenase tipo-I foram adquiridas das empresas Worthington Biochemical Corp. (EUA) e Invitrogen (EUA), respectivamente.

Os monoterpenos (-)-carvona, (+)-carvona, (-)-carveol, carvacrol e (+)-limoneno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

### 3.2.1 Diluições

A (-)-carvona e seus análogos estruturais, (+)-carvona, (-)-carveol, carvacrol e (+)-limoneno, foram dissolvidos em DMSO, formando uma solução estoque que foi mantida a -20 °C. Antes dos experimentos essa solução foi diluída, sob vigorosa agitação, no veículo que consistia da solução fisiológica utilizada e 0,1 % DMSO.

Todos os compostos lipofílicos utilizados neste estudo foram diluídos de modo a formarem um volume final de DMSO  $\leq$  0,1 %.

### 3.2.2 Soluções fisiológicas

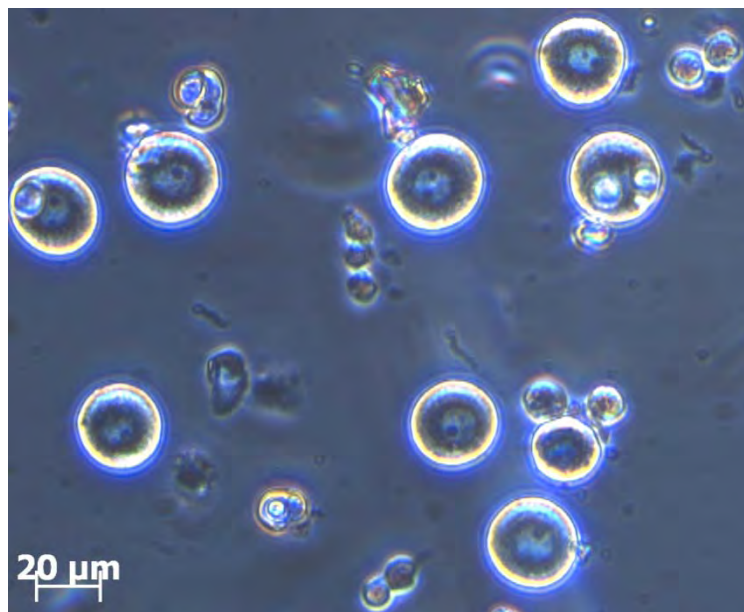
Para realização desse estudo, utilizaram-se somente soluções fisiológicas recém-preparadas, conforme descrito abaixo (em mM):

- Krebs-Ringer-Hepes (KRH): NaCl, 140; KCl, 4,5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; glicose, 10; pH= 7,4 (ajustado com NaOH);
- Solução salina de Hank tamponada (HBSS): NaCl, 137; KCl, 5,4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,25; NaHCO<sub>3</sub>, 4,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,44; Glicose, 5,6; pH= 7,4 (ajustado com NaOH);
- Locke modificada: NaCl, 150; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; glicose, 10 e HEPES, 10; pH= 7,4 (ajustado com NaOH);
- Solução salina tamponada com fosfato (PSS) baixo-Ca<sup>2+</sup>: NaCl 137; KCl 5,6; MgCl<sub>2</sub> 3,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4; NaHCO<sub>3</sub> 4,2; CaCl<sub>2</sub> 0,05; HEPES 10; pH= 7,4 (ajustado com NaOH);
- Tyrode: NaCl, 140; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 2; glicose, 10 e HEPES, 10; pH= 7,4 (ajustado com NaOH).

### 3.3 Cultivo celular

#### 3.3.1 Cultura primária de neurônios DRG

Os DRG foram dissecados cirurgicamente, entre os níveis torácicos e lombares, de ratos Wistar machos (~100 g) com quatro semanas de idade. Os gânglios foram imediatamente lavados em solução PSS baixo- $\text{Ca}^{2+}$  gelado por três vezes, através de centrifugação (150 G) por 1 min. Logo após, os DRGs foram digeridos inicialmente por papaína 0,1 % por 20 minutos, e em seguida por colagenase tipo-I 0,25 % por mais 30 minutos. Em ambos os processos, as digestões ocorreram em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, os neurônios foram dissociados mecanicamente dos gânglios por meio de suave sucção através de pipetas Pasteur de vidro, cujas pontas foram polidas e de diâmetros variados. A dissociação foi realizada em meio DMEM (Invitrogen, EUA) suplementado com SBF 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os neurônios obtidos foram então plaqueados em lamínulas pré-incubadas com poli-L-lisina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e laminina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em placas de cultura contendo DMEM suplementado com SBF 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e mantidos em atmosfera de  $\text{CO}_2$  5 % a 37 °C. A figura 10 mostra os neurônios DRG isolados de rato.



**Figura 10 – Cultura primária de neurônios DRG de rato.** Aumento de 32x (Axiovision 4.7 - Zeiss, Alemanha). Foto: Gonçalves, J.C.R. (2009).

### 3.3.2 Cultura da linhagem HEK 293

Foram utilizadas as linhagens de células embrionárias do tecido renal humano (HEK 293), em virtude do seu rápido crescimento e facilidade de transfecção, o que as tornam amplamente usadas em biologia molecular (ZAGRANICHNAYA; WU; VILLERREAL, 2005). As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando o meio MEM (Invitrogen, USA) suplementado com SBF 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células foram manipuladas em ambiente estéril sob fluxo laminar e mantidas sob atmosfera de CO<sub>2</sub> 5 % a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 h, com auxílio de microscópio invertido (Olympus, EUA), havendo a troca do meio de cultura a cada 48 h. Para manter o estoque de células, parte da cultura foi congelada em nitrogênio líquido.

## 3.4 Ensaios de citotoxicidade celular

### 3.4.1 Teste do vermelho neutro

Estes ensaios foram realizados conforme descrito inicialmente por Borenfreund e Puerner (1985), que se baseia na capacidade dos lisossomos de células viáveis em captar o vermelho neutro, um corante vital. Para tanto, foram utilizados neurônios DRG frescos (12–24 h) e plaqueados em uma densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL em placas de 96 poços, preenchidos por DMEM suplementado com SBF 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. Este meio foi removido após 24 h e substituído com o novo meio de cultura adicionado de (-)-carvona (0,5–4 mM). Apenas o veículo (DMSO 0,1 %) e doxorrubicina (1–100 µM) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 horas. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, lavaram-se os poços com Tyrode e adicionou-se o vermelho neutro a 50 µg/mL, previamente incubado por 12 horas e filtrado em membrana esterilizante. Passando-se 4 horas, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com solução de Tyrode para eliminar o excesso de corante extracelular. Em seguida, foi acrescentada a solução de lise (1 % ácido acético e 49 % etanol

absoluto) para extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. A placa foi agitada por 30 minutos e a absorvância foi medida a 570 nm, em leitor tipo ELISA (Biotek Instruments EL800, EUA).

### **3.4.2 Determinação da integridade da membrana celular**

O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídio em penetrar nas células cuja membrana esteja danificada. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do iodeto de propídio; portanto, apresentam baixa fluorescência. Células cuja membrana apresente danos estruturais permitem a entrada deste corante, que se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser (DARZYNKIEWICZ; HUANG, 2004; KRISHAN, 1975).

Para tanto, utilizou-se a linhagem HEK 293 que foram plaqueadas em placas de 24 poços em uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. Após 24 h, as células foram tratadas com o veículo (DMSO 0,1 %) e (-)-carvona (0,5–10 mM) por um período de 6 horas. A doxorrubicina (50  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. Em seguida, as células foram colhidas e marcadas com iodeto de propídio (1 mg/mL) por 5 minutos, protegido da luz, e a leitura feita em citômetro de fluxo, utilizando-se o canal FL-2 (FASC Calibur BD, EUA).

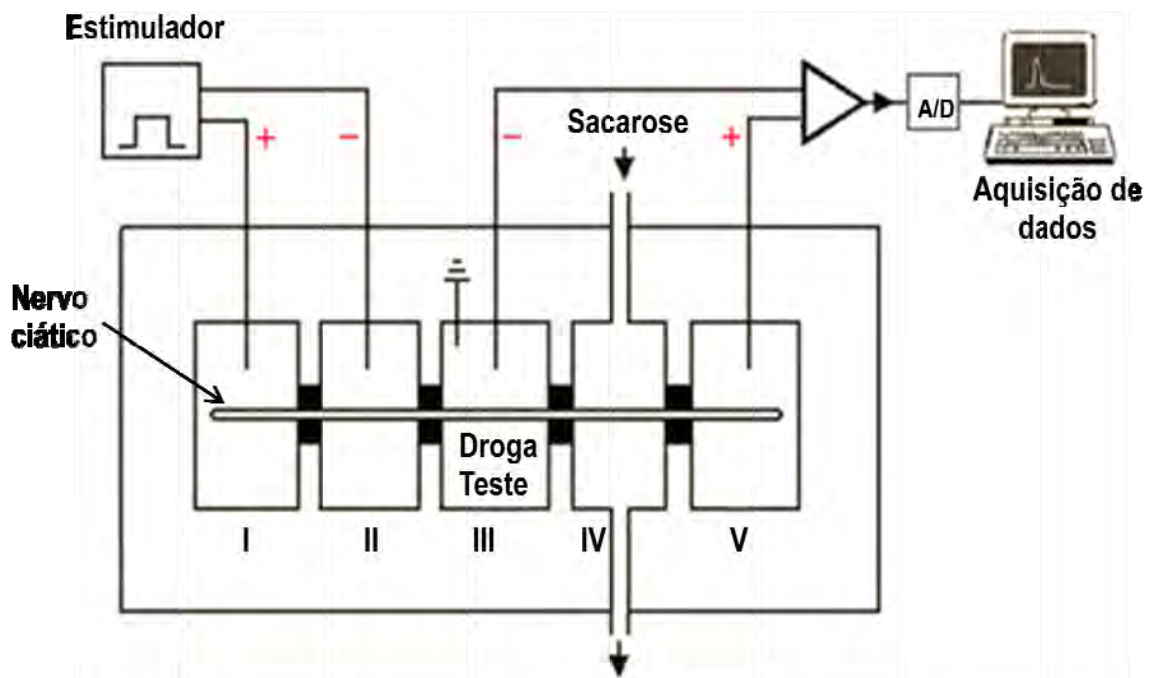
## **3.5 Ensaios eletrofisiológicos**

### **3.5.1 Técnica de registro extracelular do PAC**

Esses experimentos foram realizados por meio da técnica de *single sucrose gap*, descrita inicialmente por Stämpfli (1954), utilizando-se o nervo ciático de ratos Wistar adultos (~300 g), que foi imediatamente imerso em solução fisiológica de Locke modificada (Gonçalves et al. 2010). Após o isolamento do nervo, retirou-se a bainha de tecido conjuntivo que o envolvia com auxílio de um microscópio estereoscópico (Zeiss, Alemanha). Em seguida, o nervo foi cuidadosamente acomodado sob a linha sulcada da câmara de registros eletrofisiológicos que

continha 5 compartimentos isolados entre si (por vaselina sólida), de modo que o percurso da corrente elétrica ocorresse apenas através do nervo (Figura 11). No compartimento *IV* havia um fluxo constante de sacarose isotônica (290 mM, ~1 mL/min), usado para gerar um aumento na resistência elétrica do nervo, impedindo dessa forma, a sua captação pelo eletrodo conectado ao compartimento *V*, obtendo-se assim um registro do PAC amplificado e do tipo monofásico (Figura 12) (GONÇALVES, 2008).

Foram disparados do estimulador (CF Palmer, modelo 8048, Reino Unido) estímulos elétricos supramáximos (7–9 V), com pulsos retangulares de 0,1 ms de duração, permitindo-se selecionar as fibras mielínicas de condução rápida A $\alpha$ . Os registros controle foram obtidos antes da incubação da substância teste. Em seguida o tratamento com o composto foi realizado no compartimento *III* durante 30 min (Figura 11). Após este período, o nervo foi submetido à lavagem da substância teste por meio da perfusão pela solução de Locke (1 mL/min) durante 30 min. Os registros do PAC foram obtidos a cada 5 min. e posteriormente analisados utilizando-se programas adequados (Lynx/Brasil).



**Figura 11 – Representação esquemática da técnica de *single sucrose gap*.** Acima à esquerda está representado o estimulador. O retângulo maior representa a câmara experimental formada por cinco compartimentos (*I-V*), e o nervo ciático disposto entre eles no centro da câmara. Acima à direita está representado o amplificador (triângulo) conectado à placa conversora A/D e ao sistema de aquisição de dados. Gonçalves (2008).

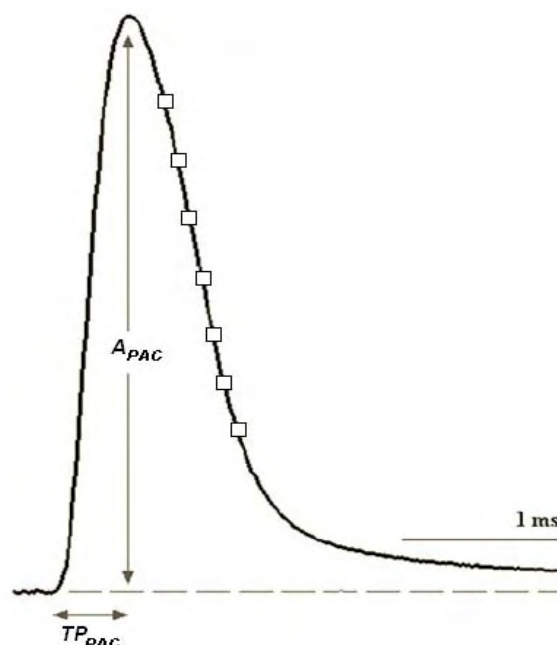
A partir dos registros do PAC obtidos, foram analisados os seguintes parâmetros (Figura 12):

a) a amplitude do PAC ( $A_{PAC}$ ), expressa em milivolts (mV) e medida pela diferença de voltagem entre a linha de base e o pico do potencial;

b) o tempo para atingir o pico do PAC ( $TP_{PAC}$ ), expresso em milisegundos (ms) e obtido pela diferença de tempo existente entre o valor de início e valor de pico do PAC;

c) a velocidade de despolarização do PAC ( $VD_{PAC}$ ), adquirido como o resultado da relação entre o valor máximo da amplitude e o tempo necessário para atingir esse valor ( $A_{PAC} / TP_{PAC}$ ), expresso em volts por segundo (V/s);

d) e a constante de tempo da repolarização ( $\tau_{rep}$ ), definida pela equação:  $V = V_0 * \exp(-t/\tau)$ , usando-se regressão não linear aplicada à fase de repolarização do PAC, onde  $V$  foi a medida da amplitude;  $V_0$  foi o valor da amplitude que cruza o eixo das ordenadas;  $t$  foi o tempo de repolarização (em ms); e  $\tau$  a constante de tempo de repolarização obtida (em ms) (GONÇALVES, 2008).



**Figura 12 – Registro típico do PAC obtido por meio da técnica de *single sucrose gap* e seus parâmetros.** A linha de base está representada pela linha tracejada e as setas duplas indicam como a amplitude ( $A_{PAC}$ ) e o tempo para atingir o pico ( $TP_{PAC}$ ) do PAC foram medidos. Os quadrados vazados na fase de repolarização (descendente) representam os pontos utilizados para o ajuste da constante de repolarização ( $\tau_{rep}$ ). Gonçalves (2008).

### 3.5.2 Técnica de *Patch-clamp*

A partir da técnica de *Patch-clamp* (HAMILL et al, 1981) é possível avaliar a atividade de canais iônicos medindo-se suas correntes iônicas em fragmentos de membrana isolados eletricamente com um microeletrodo de vidro.

A aparelhagem utilizada para esta técnica foi constituída de um microscópio invertido Axio A1 (Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera CCD AxioCam MRC5 (Zeiss, Alemanha) onde foi possível monitorar as células em tempo real. Um conjunto de micromanipuladores (Narishige, Japão) foi utilizado para movimentar o eletrodo de registro e da pipeta de perfusão. Esses equipamentos foram mantidos em uma mesa anti-vibratória (TMC, EUA) que estavam envolvidos pela gaiola de Faraday (TMC, EUA).

Os eletrodos foram produzidos a partir de capilares de vidro (Narishige, Japão) e estirados em um *puller* vertical (Narishige, Japão), de modo a gerar resistências de 3–5 M $\Omega$  (CUMMINS et al., 2009).

Para aquisição dos registros, utilizou-se um modulo acoplado amplificador-placa conversora A/D modelo EPC 10 (Heka, Alemanha), conectado a um computador PC compatível. Os dados obtidos foram posteriormente analisados pelo programa PatchMaster 2.30 (Heka, Alemanha).

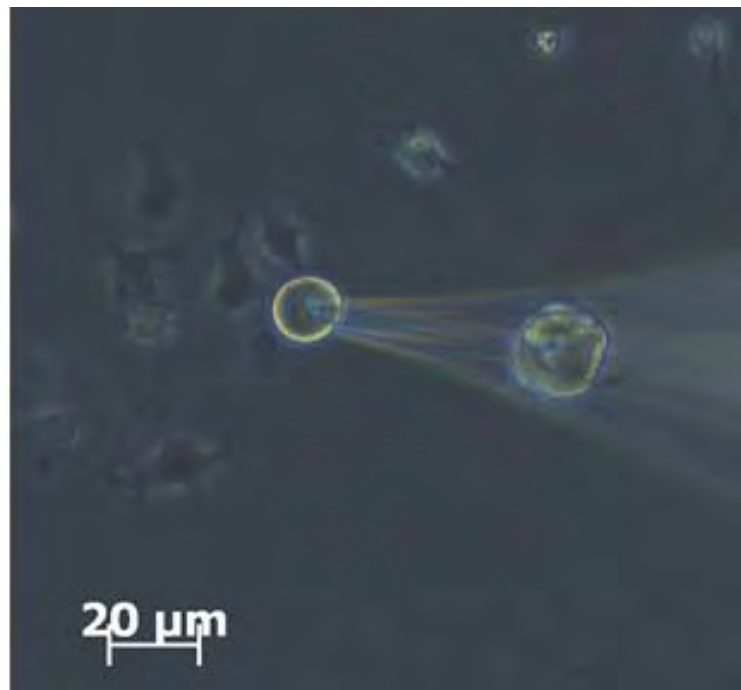
#### 3.5.2.1 Obtenção de correntes totais de Na<sup>+</sup> em neurônios DRG

As correntes totais de Na<sup>+</sup> foram medidas utilizando a solução externa composta por (em mM): NaCl 70, Cho-Cl 70, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 1, TEA-Cl 20, CdCl 0,1, glicose 10 e HEPES 10, com pH foi ajustado para 7,3 (com NaOH) e a osmolaridade para 320 mOsmol/L (ajustado com glicose). A solução interna foi constituída de (em mM): CsF 140, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, EGTA 1,1 e HEPES 10, com pH ajustado para 7,2 (com CsOH) e a osmolaridade para 310 mOsmol/L (ajustado com glicose) (CUMMINS et al., 2009).

Para obtenção das correntes, utilizou-se o modo *whole-cell patch-clamp*, aplicando-se um protocolo que consistia de um pré-pulso de -100 mV, com duração de 500 ms, a partir de um potencial de *holding* de -80 mV, seguido do pulso teste de

-10mV, com duração de 40 ms (HUANG; SONG, 2008). Para avaliação da dependência de voltagem do canal de Na<sup>+</sup>, foram aplicados pré-pulsos de -100 mV, com duração de 500 ms, seguido de pulsos testes que variavam de -80 a +60 mV, com duração de 40 ms, com incremento de 10 mV e intervalo de 2 ms, entre a aplicação dos pulsos. A frequência de amostragem para os protocolos descritos foi de 40 kHz. As correntes de vazamentos foram subtraídas digitalmente por meio do procedimento P4 (CUMMINS et al., 2009). Os neurônios DRG utilizados nesses experimentos (Figura 13) foram classificados de acordo com o diâmetro (15–30 μm) e a capacitância de membrana ( $C_m$ ) ≤45 pF (HUANG; SONG, 2008). As correntes obtidas foram normalizadas a partir dos valores de  $C_m$  de cada célula.

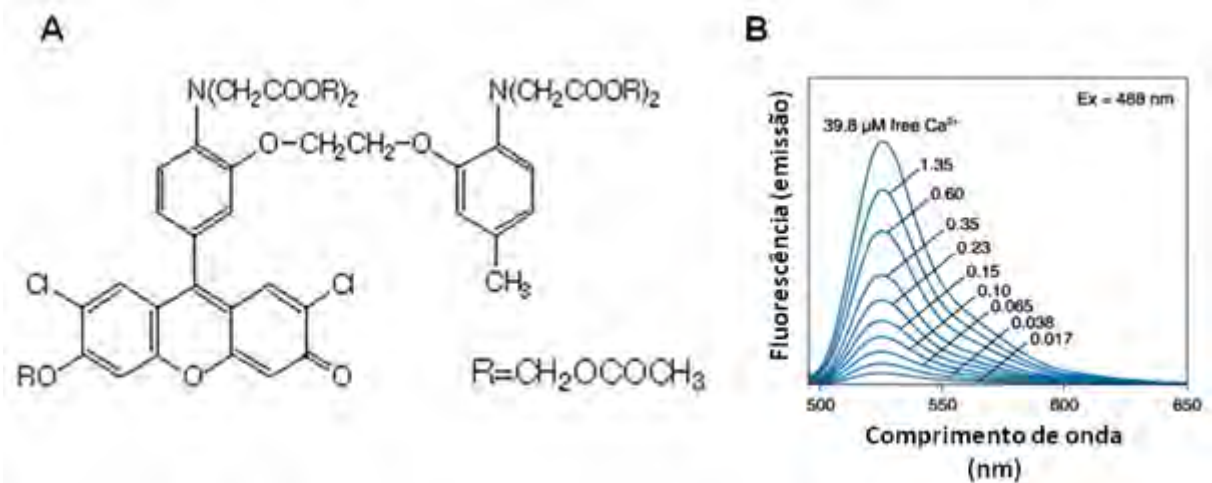
Para investigar o efeito de (-)-carvona sobre as correntes totais de Na<sup>+</sup>, uma solução (1 mM) deste monoterpene diluída no banho externo, foi aplicada diretamente à célula por meio de uma pipeta de perfusão (100 μL/min), por um período de 3 min, logo após a aquisição de correntes controle e da perfusão do veículo (DMSO 0,1%).



**Figura 13 – Técnica de *Patch-clamp* em neurônio DRG de pequeno diâmetro.** Aumento de 32x. Foto: Gonçalves, J.C.R. (2009).

### 3.6 Monitoramento da concentração de $\text{Ca}^{2+}$ em neurônios DRG

Esses experimentos foram conduzidos com o plaqueamento de aproximadamente  $3 \times 10^4$  neurônios/mL marcados pelo Fluo-3/AM (5  $\mu\text{M}$ ) (Figura 14) diluído em DMSO (0,1 %) e ácido plurônico (0,1 %), por 30 min a 37 °C. Após o período de incubação as células foram suavemente lavadas com solução KRH zero- $\text{Mg}^{2+}$ , três vezes durante 30 min. Após a lavagem as células foram imediatamente submetidas à experimentação por meio de microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse Ti, Japão) acoplada à uma câmera CCD Photometrics Cool Snap HQ<sup>2</sup> (Photometrics, EUA) e um *shutter* Prior ProScan II (Prior Scientific, USA), onde as variações de cálcio foram avaliadas em filtros de 488 nm (excitação) e 515 nm (emissão). No final de cada experimento foram adicionados ionomicina (5  $\mu\text{M}$ ) seguido de EGTA (20 mM), para a calibração da fluorescência máxima e mínima, respectivamente. Após os ensaios, apenas os neurônios medindo 15–30  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram selecionados e a intensidade de fluorescência emitida pelos mesmos foi analisada por meio do programa Nis Elements Ar (Nikon, Japão).



**Figura 14 – Monitoramento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelo Fluo-3/AM.** A. Molécula do Fluo-3/AM. B. Variação no espectro de excitação do Fluo-3/AM frente a diferentes concentrações do  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Fonte: Invitrogen (EUA).

### 3.7 Avaliação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2

Para este estudo, utilizaram-se linhagem de células HEK 293 estavelmente transfectadas com a construção FLAG-hTRPM2/pcDNA/TO (T-REx/TRPM2), conforme descrito por Perraud e col. (2005). As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando o meio DMEM (Invitrogen, USA) suplementado com SBF 10 %, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e mantidos em atmosfera 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Para os experimentos realizados nesse estudo, as células T-REx/TRPM2 foram cultivadas em dois grupos distintos, constituídos de células pré-incubadas por doxiciclina (1 µg/mL), adicionada ao meio de cultura, por um período de 12–24 h, e um outro grupo de células não tratadas por este antibiótico. A doxiciclina funcionava como um ativador da expressão de canais TRPM2 nessas células (Perraud et al., 2005), e por convenção, as células expressando esses canais foram chamadas de TRPM2+, enquanto que as que não foram incubadas por doxiciclina foram chamadas de TRPM2-.

#### 3.7.1 Monitoramento do Ca<sup>2+</sup> intracelular em células T-REx/TRPM2

Para os ensaios de fluorescência pelo Ca<sup>2+</sup> nessas células, utilizou-se o marcador Fluo-3/AM (5 µM), adicionado ao meio de cultura, por 30 min de incubação a 37 °C. Em seguida o excesso foi removido por meio de lavagem com KRH por três vezes consecutivas e em seguida as placas contendo as células foram mantidas em repouso por 30 min adicionais em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período as células foram imediatamente transferidas para o aparato de microscopia confocal com escaneamento à laser (Bio-Rad, EUA), acoplado a um microscópio (Zeiss-Axiovert 100, Alemanha). As análises de fluorescência foram feitas pelo *software* LaserSharp 3.0 (Zeiss, Alemanha).

## 3.8 Avaliação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1

### 3.8.1 Ensaios em biologia molecular

#### 3.8.1.1 Vetores

O vetor pEGFP-C1 e pmCherry-N1 foram adquiridos da ClonTech (EUA).

O cDNA para expressão do canal TRPV1 (cDNA-TRPV1) foi gentilmente doado pelo Dr. David Julius (UCSF, USA) o qual foi clonado em pCDNA3 (Invitrogen, USA) usando-se os sítios para *Bst*XI e *Not*I (CATERINA et al., 1997).

#### 3.8.1.2 Transformação bacteriana

A bactéria utilizada para clonagem foi a *Escherichia coli* linhagem DH5 $\alpha$ , e foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) composto por 1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura e 1 % NaCl. Para meios sólidos LB adicionou-se 1,5 % de ágar. Ocasionalmente, o antibiótico referente ao gene de resistência do vetor utilizado, foi adicionado na concentração de 0,1 mg/mL. As culturas foram mantidas por no máximo um dia em estufa bacteriológica a 37 °C.

Bactérias *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) eletrocompetentes foram transformadas com o cDNA-TRPV1 por eletroporação, usando-se um eletroporador (BioRad, EUA) e posteriormente plaqueadas em meio LB ágar contendo 100  $\mu$ g/mL de antibiótico. As colônias foram analisadas através de PCR de colônias e os plasmídeos das colônias positivas foram purificados através do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA). Foi feita análise de restrição e sequenciamento do DNA para confirmação da identidade do inserto.

### 3.8.1.3 Verificação da presença de inserto

Para tanto foi realizado PCR de colônias, onde a reação de amplificação continha em torno de 1 µg de uma colônia isolada, 1 µM de *primers* TRPV1-F (cacagcgactcctgctagtg) e TRPV1-R (ggccactcactatgccatct), 250 µM de desoxirribonucleotídeos fosfatado (dNTPs), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de tampão 10X e duas unidades da enzima *Taq* polimerase (Promega, EUA). As condições de amplificação consistiram em um período de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos seguido de quarenta ciclos. Cada ciclo apresentava um período de desnaturação do DNA a 94 °C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 55° C por 45 segundos e extensão da nova molécula a 72 °C por 45 segundos. Por fim, um período final de extensão a 72 °C por 5 minutos e estoque a 4 °C.

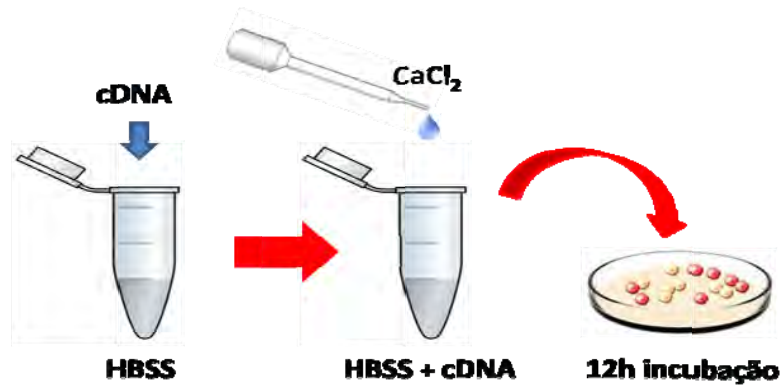
O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1mmol/L pH 8,0), corado com brometo de etídio e purificado utilizando-se o kit de extração em gel QIAquick™ Gel Extraction kit (Qiagen, EUA).

### 3.8.2 Transfecção transiente pelo método do fosfato de cálcio

A co-precipitação de DNA com fosfato de cálcio foi um dos primeiros sistemas de transfecção descritos por Graham & Van Der Eb (1973) e posteriormente utilizado em células eucariontes por Wigler e col. (1977), apresentando algumas vantagens pela segurança, simplicidade e baixo custo. Esse método baseia-se no fato de que algumas células absorvem de forma eficiente o DNA quando este forma um precipitado com fosfato de cálcio. Modificações desse método têm possibilitado um aumento na eficiência da transfecção de DNA (JORDAN; WURM, 2004).

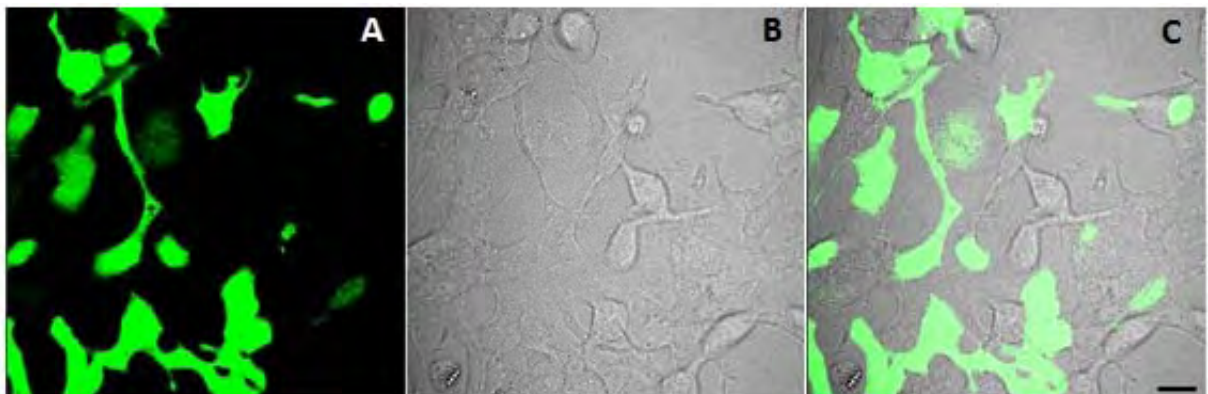
Nesse estudo a transfecção pelo método do fosfato de cálcio foi realizada com a mistura do DNA de escolha (~1 µg) em solução salina de Hanks tamponada (HBSS), seguida pela adição de 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M gota-a-gota em um tubo de 1,5 mL (Figura 15). A mistura foi em seguida adicionada cuidadosamente a uma placa de cultura de células HEK 293 com aproximadamente 80 % de confluência, posteriormente deixando-a em repouso de 12 h em atmosfera composta por 5 % de

CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com HBSS e então mantidas em meio MEM completo na estufa biológica (5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C) por um intervalo de 12-24 h antes da realização dos experimentos.



**Figura 15 – Transfecção transiente pelo método do fosfato de cálcio.**

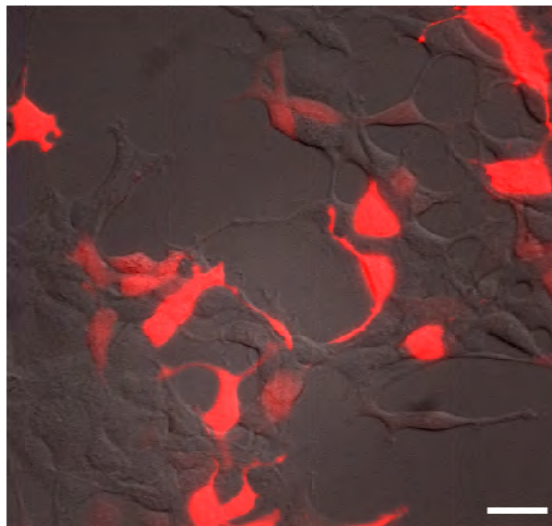
A verificação da eficiência de transfecção foi previamente analisada utilizando-se o pEGFP-C1 (Anexos), por microscopia confocal, calculando-se a percentagem de células fluorescentes ao EGFP (Ex488; Em510 nm) em razão das não-fluorescentes (Figura 16).



**Figura 16 – Transfecção de células HEK 293 pelo método do fosfato de cálcio.** As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando-se o pEGFP como marcador para as células eficientemente transfectadas. A) Apenas as células transfectadas (F488 nm); B) Células totais observadas por luz transmitida; C) Superposição das imagens A e B. Escala: 20 µM.

### 3.8.3 Expressão heteróloga de canais TRPV1 em células HEK 293

Durante os ensaios de transfecção do cDNA-TRPV1, utilizou-se 1 µg total de DNA pelo método do fosfato de cálcio conforme descrito acima. O cDNA que codifica a proteína fluorescente m-Cherry, clonado no vetor pmCherry-N1, foi co-transfectado (0,1 µg) e utilizado como marcador fluorescente, utilizando-se o filtro de 515 nm, para identificar apenas as células que incorporaram o cDNA/TRPV1 (Figura 17). As células HEK foram então divididas em três grupos distintos, sendo o primeiro constituído de células que não receberam qualquer cDNA, outro por células expostas apenas ao pmCherry e por último um grupo co-transfectado por pmCherry e cDNA/TRPV1. Capsaicina (5 µM) e capsazepina (10 µM) foram utilizadas para induzir a ativação e bloqueio dos canais TRPV1, respectivamente, nessas células.



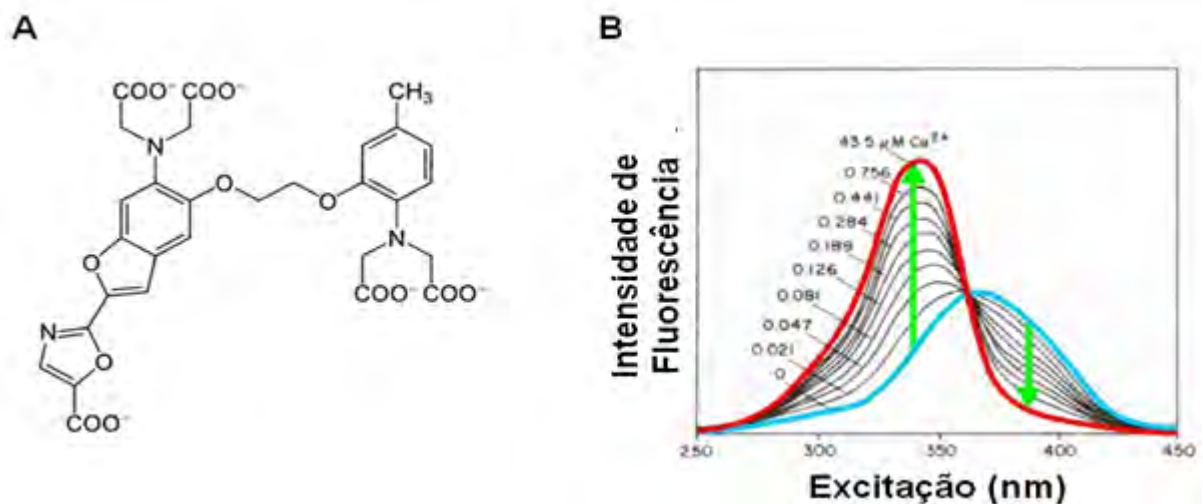
**Figura 17 – Co-transfecção de TRPV1 e m-Cherry em células HEK 293.** A imagem foi obtida por luz transmitida e então sobreposta por fluorescência (Ex515 nm). Objetiva 40x. Escala: 20 µm.

### 3.8.4 Monitoramento do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular em células HEK 293 expressando TRPV1

O desenvolvimento do Fura-2 por Williams e col. (1985) permitiu uma melhor compreensão do papel do cálcio nos processos celulares. O Fura-2 é um indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  que tem o seu espectro de absorção de luz alterado, em ambas as faixas de

340 e 380 nm, quando estes íons ligam-se nos grupos carboxil (COO<sup>-</sup>) presentes na sua molécula (Figura 18). A razão das fluorescências F340/F380 nm minimiza os problemas comuns a esses tipos de experimentos, como marcação irregular da célula, *foto-bleaching* e vazamento do marcador. As medidas de F340/F380 pelo Fura-2, permitem, ainda, determinar com certa precisão a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), através da equação:  $[Ca^{2+}]_i = Kd * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{max380} / F_{min380})$  inicialmente proposta por Grynkiewicz e col. (1985), onde *Kd* é a constante de dissociação do Fura-2; *R* é a razão F340/F380; *R<sub>max</sub>* e *R<sub>min</sub>* representam a razão máxima e mínima de fluorescência; *F<sub>max380</sub>* e *F<sub>min380</sub>* são a fluorescência máxima e mínima obtidas em F380 nm.

Esses ensaios foram realizados por epifluorescência através de um microscópio Leica SP5 (Alemanha) utilizando-se objetiva seca de 40X (Leica, Alemanha). As imagens foram obtidas por uma câmera CCD (Hamamatsu, Japão) que foi acoplada ao microscópio, e analisadas posteriormente pelo software Leica AF6000 (Leica, Alemanha). Os filtros de escolha foram de 340/380 nm (excitação) e 510 nm (emissão) para avaliar as variações de fluorescência pelo Fura-2/AM (5 µM), incubado de forma semelhante ao Fluo-3/AM, conforme descrito acima. A calibração da [Ca<sup>2+</sup>-livre] foi realizada no final de cada experimento pela ionomicina (5 µM) e EGTA (20 mM).



**Figura 18 – Monitoramento do Ca<sup>2+</sup> intracelular pelo Fura-2.** A. Molécula do Fura-2. B. Variação no espectro de excitação do Fura-2 frente a diferentes concentrações do Ca<sup>2+</sup> livre. Fonte: Invitrogen (EUA).

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos durante o presente estudo foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, EUA), realizando-se os seguintes testes estatísticos:

- ANOVA seguido de teste de Dunnet, para os experimentos de viabilidade celular;
- Teste *t* de Student, para os ensaios eletrofisiológicos;
- ANOVA seguido de teste de Dunnet ou Tukey, para os experimentos de imageamento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

# Resultados

---

## 4 RESULTADOS

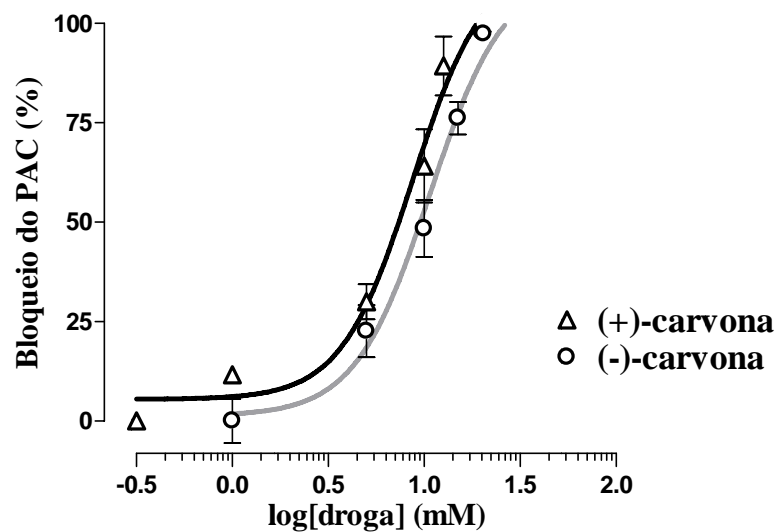
### 4.1 Avaliação estrutura-atividade dos análogos de (-)-carvona sobre a excitabilidade do nervo periférico de rato

De acordo com estudos anteriores, foi demonstrado que (-)-carvona exercia efeito bloqueador sobre a excitabilidade de nervo periférico de rato, provocando uma redução na amplitude do potencial de ação composto (PAC) em nervo isquiático de rato (GONÇALVES, 2008; GONÇALVES et al. 2008). Com base nesses dados, realizou-se inicialmente um estudo estrutura-atividade, com a finalidade de se investigar a influência dos grupos estruturais, como os radicais hidroxila (OH) e carbonila (C=O), aromaticidade ou estereoisomeria, sobre os efeitos deste monoterpeno.

Para tanto, comparou-se a potência entre os compostos estereoisômeros (+)-carvona e (-)-carvona, com o objetivo de avaliar a importância da estereoisomeria sobre o efeito destes monoterpenos na excitabilidade periférica de rato. Nesse sentido, testou-se o efeito de (+)-carvona (0,5–15 mM) sobre a amplitude do PAC por meio da técnica de *single sucrose gap*, cujos valores foram normalizados a partir do controle e então aplicados, por regressão não-linear, à equação de Hill:  $f = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / 1 + 10^{((\log[C_{50} - \text{droga}]) * n)}$ , onde *Max* e *Min* representam  $[Ca^{2+}]$  máxima e mínima, respectivamente, em função do *log* da concentração da droga ([droga]). O coeficiente de Hill é aqui representado por *n*.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que (+)-carvona bloqueava a amplitude do PAC de modo dependente de sua concentração (Figura 19), exibindo uma  $CI_{50}$  de  $8,7 \pm 0,1$  mM (Hill= 2,3) (Gráfico 1). Este último mostrou-se relativamente mais potente que o seu estereoisômero (-)-carvona, cuja  $CI_{50}$  de  $10,7 \pm 0,1$  mM (Hill= 2,2), conforme demonstrada anteriormente por Gonçalves (2008).

**Figura 19 – Efeito de (+)-carvona sobre o PAC de nervo periférico de rato.** A) Registros representativos do PAC e superpostos após incubação de (+)-carvona (5–15 mM). O controle foi obtido antes da incubação por (+)-carvona. Parâmetros de estimulação: ~10 V/0,05-0,1 ms.

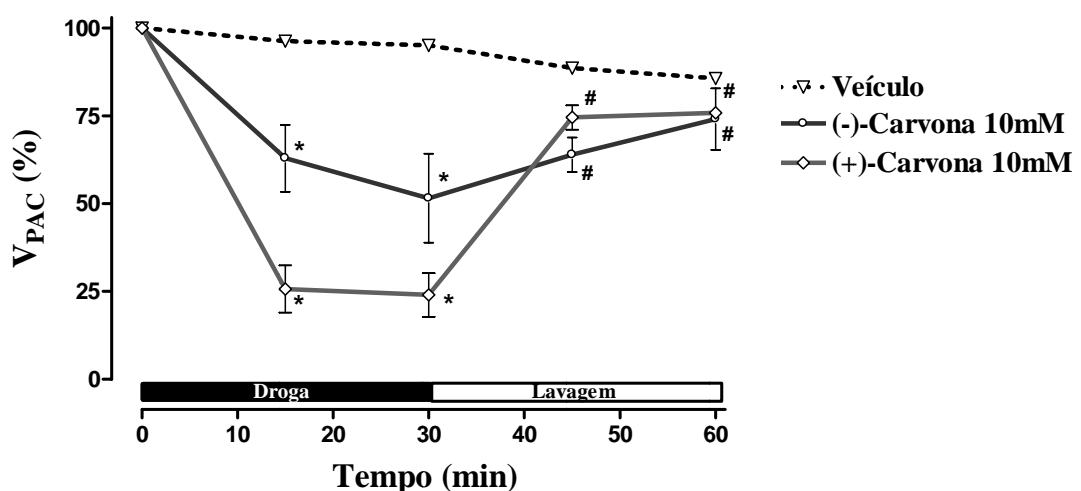


**Gráfico 1 – Dependência de concentração de (-)- e (+)-carvona sobre o bloqueio da excitabilidade nervosa.** B) Curvas concentração-resposta de (+)- e (-)-carvona sobre o bloqueio do PAC após 30 min de incubação. Os valores foram normalizados a partir do controle (0%) e ajustados à equação de Hill:  $f = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / 1 + 10^{((\log IC_{50} - [\text{droga}]) * n)}$ . Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. (n = 4).

A partir de então se utilizou a concentração de 10 mM para comparar os efeitos dos enantiômeros de carvona sobre as características do PAC. Observou-se que, da mesma forma que a (-)-carvona, os efeitos de (+)-carvona foram revertidos após lavagem (Figura 20). Este último composto reduziu  $V_{PAC}$  de  $50,8 \pm 3,4$  mV

(controle) para  $27,2 \pm 7,1$  mV ( $24,0 \pm 6,2$  %;  $p < 0,05$ ), o que foi parcialmente revertido para  $30,8 \pm 6,4$  mV ( $75,9 \pm 1,5$  %;  $p > 0,05$ ) após 30 min de lavagem (Gráfico 2).

**Figura 20 – Reversibilidade dos efeitos de (-)- e (+)-carvona sobre o PAC de nervo periférico de rato.** A) Registros representativos do PAC após incubação por 30 min de (-)- e (+)-carvona (10 mM). O controle foi obtido antes da incubação pelas respectivas drogas. Parâmetros de estimulação:  $\sim 10$  V/0,05-0,1 ms.



**Gráfico 2 – Reversibilidade dos efeitos de (-)- e (+)-carvona sobre  $V_{PAC}$ .** Os valores de  $V_{PAC}$  foram normalizados a partir do controle (100%) e adquiridos durante 60 min de experimento na presença de (-)- ou (+)-carvona (10 mM) e após lavagem dessas drogas pelo veículo. Os triângulos vazados representam a incubação feita apenas pelo veículo. Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 4$ ); \* $p < 0,05$  vs controle; # $p < 0,05$  vs 30 min de perfusão. Teste “t” de Student.

Ao avaliarem-se os efeitos dos enantiômeros de carvona sobre os parâmetros de despolarização e repolarização do PAC,  $VD_{PAC}$  e  $\tau_{rep}$ , respectivamente, percebeu-se que ambos atuam de maneira semelhante sobre a excitabilidade nervosa. Os dados obtidos foram mostrados na Tabela 1, onde observa-se que ambos os compostos reduziram  $VD_{PAC}$  em torno de 50% a partir do controle, parâmetro este que foi revertido após 30 min de lavagem. Da mesma forma, (+)- ou (-)-carvona não foram capazes de provocar qualquer alteração significativa sobre  $\tau_{rep}$  (Tabela 1).

**Tabela 1 – Comparação dos efeitos de (-)- e (+)-carvona (10 mM) sobre as características do PAC.** Os valores de  $V_{PAC}$ ,  $VD_{PAC}$  e  $\tau_{rep}$  foram calculados em 30 min de exposição dessas drogas sobre o nervo e após 30 min de lavagem das mesmas pelo veículo. Dados expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=4); \*p< 0,05 vs controle, #p< 0,05 vs 30 min perfusão. Teste “t” de Student.

Monoterpeno	Situação	Parâmetros do PAC		
		$V_{PAC}$ (mV)	$VD_{PAC}$ (V/s)	$\tau_{rep}$ (ms)
<b>(-)-carvona (10 mM)</b>	controle	50,8 $\pm$ 3,4	105,2 $\pm$ 13,7	0,35 $\pm$ 0,02
	incubação (30 min)	27,2 $\pm$ 7,1*	50,4 $\pm$ 15,1*	0,35 $\pm$ 0,04
	lavagem (30 min)	30,8 $\pm$ 6,4*#	70,0 $\pm$ 9,3*	0,36 $\pm$ 0,03
<b>(+)-carvona (10 mM)</b>	controle	39,4 $\pm$ 2,0	84,0 $\pm$ 17,9	0,40 $\pm$ 0,02
	incubação (30 min)	9,8 $\pm$ 3,0*	38,3 $\pm$ 14,6*	0,39 $\pm$ 0,03
	lavagem (30 min)	29,9 $\pm$ 1,6*#	48,6 $\pm$ 5,9	0,44 $\pm$ 0,02

Para investigar se a presença ou ausência de substituições de grupos OH, C=O ou da aromaticidade da molécula, poderiam influenciar no modo de ação de (-)-carvona, utilizou-se os compostos (-)-carveol, (+)-limoneno e o carvacrol (Figura 21) ambos na concentração de 10 mM, avaliando-se o efeito desses compostos sobre as características do PAC.

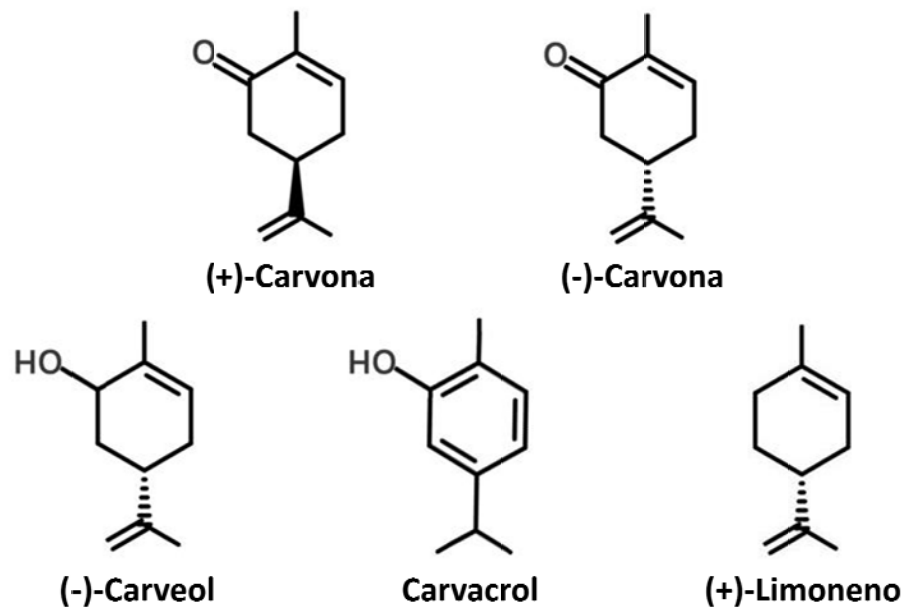
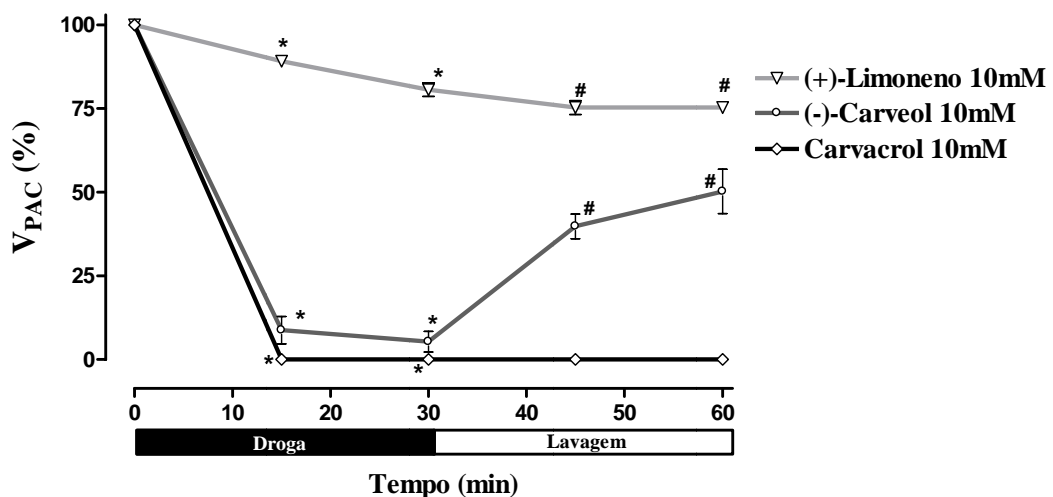


Figura 21 – Análogos estruturais de carvona usados no estudo estrutura-atividade.

Com a redução do grupo cetônico ( $C=O$ ) para uma hidroxila, ou mesmo com a substituição do anel alifático pelo aromático, observou-se praticamente um bloqueio total de  $V_{PAC}$  por (-)-carveol (10 mM), reduzindo de  $24,6 \pm 2,0$  mV (controle) para  $1,3 \pm 0,8$  mV ( $5,4 \pm 3,1$  %;  $p < 0,05$ ), um bloqueio total por carvacrol (10 mM), quando estes compostos eram aplicados por 30 min sobre o nervo, separadamente (Figura 22; Gráfico 3). Entretanto, destes, apenas o efeito do (-)-carveol foi revertido por lavagem (Figura 22; Gráfico 3). Por outro lado, a ausência dos grupos  $C=O$ ,  $OH$  ou do anel aromático, evidenciados pelo (+)-limoneno, praticamente aboliram o efeito inibitório sobre o PAC (Figura 22; Gráfico 3).

**Figura 22 – Reversibilidade dos efeitos de (-)-carveol, carvacrol e (+)-limoneno sobre o PAC de nervo periférico de rato.** A) Registros representativos do PAC após incubação por 30 min de (-)-carveol, carvacrol e (+)-limoneno, ambos em 10 mM. O controle foi obtido antes da incubação pelas respectivas drogas. Parâmetros de estimulação: ~10 V/0,05-0,1 ms.



**Gráfico 3 – Reversibilidade dos efeitos de (+)-limoneno, (-)-carveol e carvacrol sobre  $V_{PAC}$ .** Os valores de  $V_{PAC}$  foram normalizados a partir do controle (100%) e adquiridos durante 60 min de experimento na presença de (+)-limoneno, (-)-carveol ou carvacrol, ambos a 10 mM, e após lavagem dessas drogas pelo veículo. Os triângulos vazados representam a incubação feita apenas pelo veículo. Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. (n= 4); \*p< 0,5 vs controle; #p< 0,05 vs 30 min de perfusão pelas drogas. Teste “t” de Student.

Com a finalidade de avaliar se a diferença nos efeitos observados estariam implicados diretamente com a solubilidade desses compostos, os dados de  $V_{PAC}$ , adquiridos a cada 5 min de incubação sobre o nervo, foram normalizados e em seguida ajustados à equação de decaimento mono-exponencial:  $f=(Max-Min)*exp(-K*tempo)+Min$ , onde  $K$  era a constante de decaimento;  $Max$  e  $Min$  eram os valores máximos e mínimos de  $V_{PAC}$ , respectivamente. Dessa forma, os valores de  $K$  obtidos, em ordem decrescente foram (em mV/min): (-)-carveol ( $0,30\pm 0,03$ ) > (+)-carvona ( $0,23\pm 0,04$ ) > carvacrol ( $0,16\pm 0,02$ ) > (-)-carvona ( $0,09\pm 0,01$ ) > (+)-limoneno ( $0,02\pm 0,02$ ) (Gráfico 4).

**Gráfico 4 – Estabelecimento do efeito dos análogos de carvona durante 30 min de incubação.** Os valores de VCAP foram normalizados a partir do controle (100%) e registrados a cada 5 min de incubação pelos monoterpênicos na concentração de 10 mM. Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. (n= 4). Os dados foram ajustados à equação:  $f=(Max-Min)*exp(-K*tempo) + Min$ .

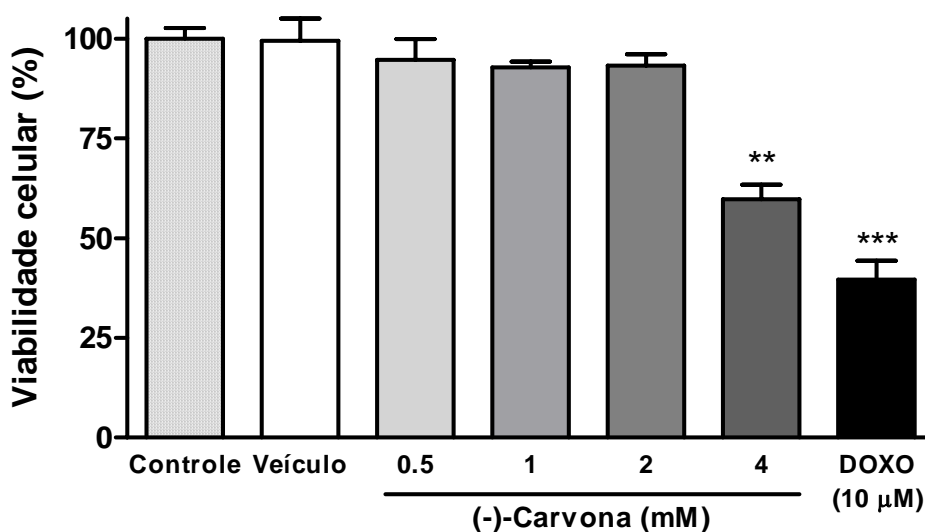
#### 4.2 Determinação da citotoxicidade de (-)-carvona

Com a finalidade de determinar a faixa de concentração em que (-)-carvona pudesse ser usada com segurança sobre os tipos celulares utilizados no presente estudo, realizaram-se ensaios de citotoxicidade como o teste do vermelho neutro e de citometria de fluxo pelo iodeto de propídio.

#### 4.2.1 Citotoxicidade de (-)-carvona em neurônios DRG

Os resultados obtidos pelo teste do vermelho neutro em neurônios DRG indicaram que (-)-carvona não apresentou qualquer efeito citotóxico nessas células, após 24h de incubação, quando utilizada em concentrações menores que 2 mM (Gráfico 5). No entanto, 4 mM desse monoterpene foi capaz de reduzir cerca de  $40,0 \pm 2,1$  % a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 5). O veículo utilizado (DMSO 0,1%) não apresentou efeito citotóxico quando submetido às mesmas condições (Gráfico 5).

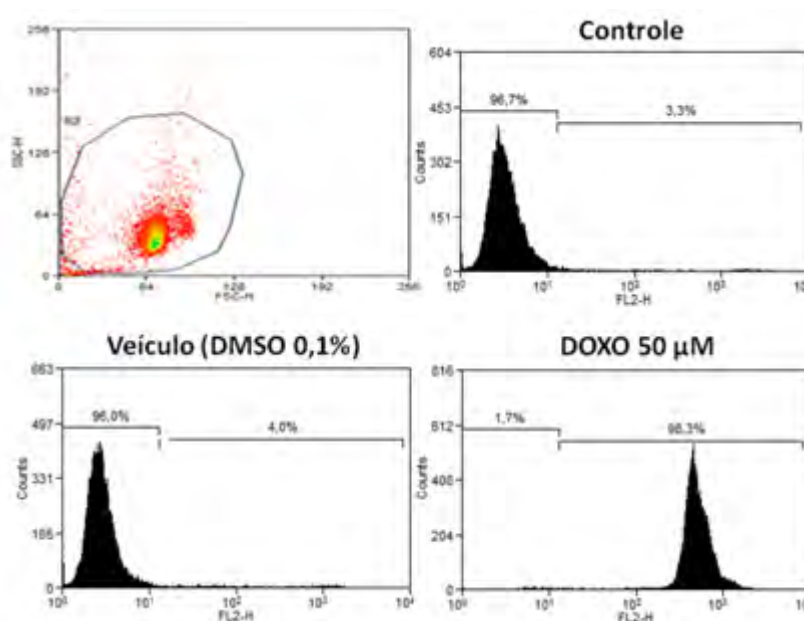
Para avaliar a confiabilidade desse teste, utilizou-se a doxorrubicina como controle positivo (FORNARI et al., 1994; LOPES et al., 2011) de droga citotóxica, durante os experimentos executados com (-)-carvona. Como esperado, doxorrubicina (DOXO) demonstrou alta toxicidade neuronal, onde 10  $\mu$ M foi capaz de reduzir  $39,6 \pm 4,7$  % a viabilidade celular (Gráfico 5).



**Gráfico 5 – Citotoxicidade de (-)-carvona em neurônios DRG.** A viabilidade celular foi determinada pelo teste do vermelho neutro, após 24h de tratamento, e em seguida normalizada à partir dos níveis de absorvância do grupo controle. Doxorrubicina (DOXO, 10  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. ( $n=3$ ; duplicata;  $5 \times 10^5$  células/mL). \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA seguido do teste de Dunnet.

#### 4.2.2 Citotoxicidade de (-)-carvona sobre células HEK 293

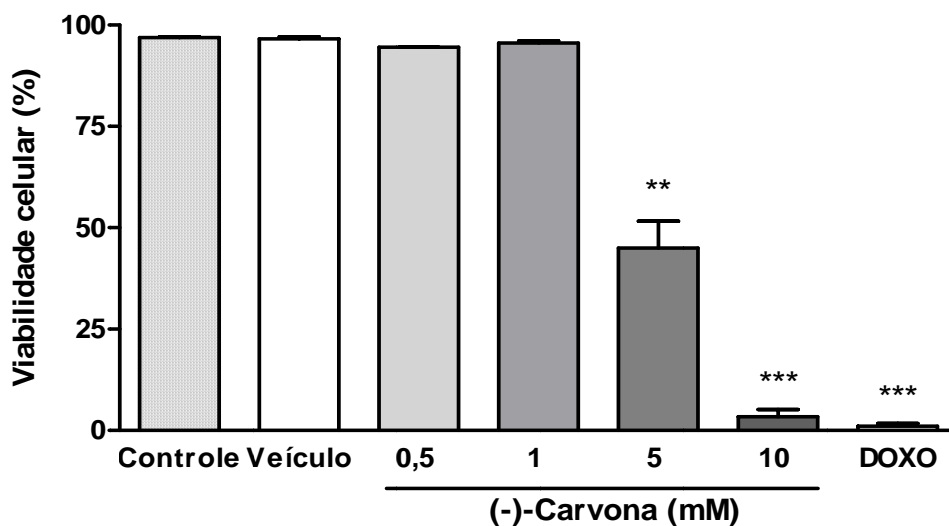
Por citometria de fluxo em células HEK 293 marcadas com iodeto de propídio, foi possível determinar a viabilidade dessas células após tratamento com (-)-carvona. É importante ressaltar que o veículo (DMSO 0,1%) não foi capaz de provocar qualquer variação na viabilidade celular, quando comparada com o grupo controle. Como esperado, doxorubicina (DOXO, 50  $\mu$ M) induziu 99,9 $\pm$ 0,6 % de morte celular (Figura 23; Gráfico 6).



**Figura 23 – Determinação da viabilidade de células HEK 293 por citometria de fluxo.** Os histogramas representam a quantidade de células em função da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio nas situações controle, controle-negativo (DMSO 0,1 %) e controle-positivo (DOXO 50  $\mu$ M). Acima à esquerda está representado o *gating* para esses experimentos (Filtro FL2-H).

A (-)-carvona, por sua vez, apenas nas concentrações maiores que 5 mM foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular em torno de 55,0 $\pm$ 6,7 % a partir do controle. Quando tratadas com concentrações de 0,5 e 1 mM de (-)-carvona, as células HEK 293 não apresentaram nenhuma mudança na viabilidade (Figura 24; Gráfico 6), enquanto que 10 mM provocou o máximo de morte (96,6 $\pm$ 1,8 %) (Figura 24; Gráfico 6). A partir desses resultados foi possível definir que (-)-carvona possui baixa citotoxicidade em células HEK 293, apresentando uma EC<sub>50</sub> de 4,9 $\pm$ 0,1 mM.

**Figura 24 – Efeito de (-)-carvona sobre a viabilidade de células HEK 293.** Os histogramas representam a quantidade de células em função da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio (Filtro FL2-H).



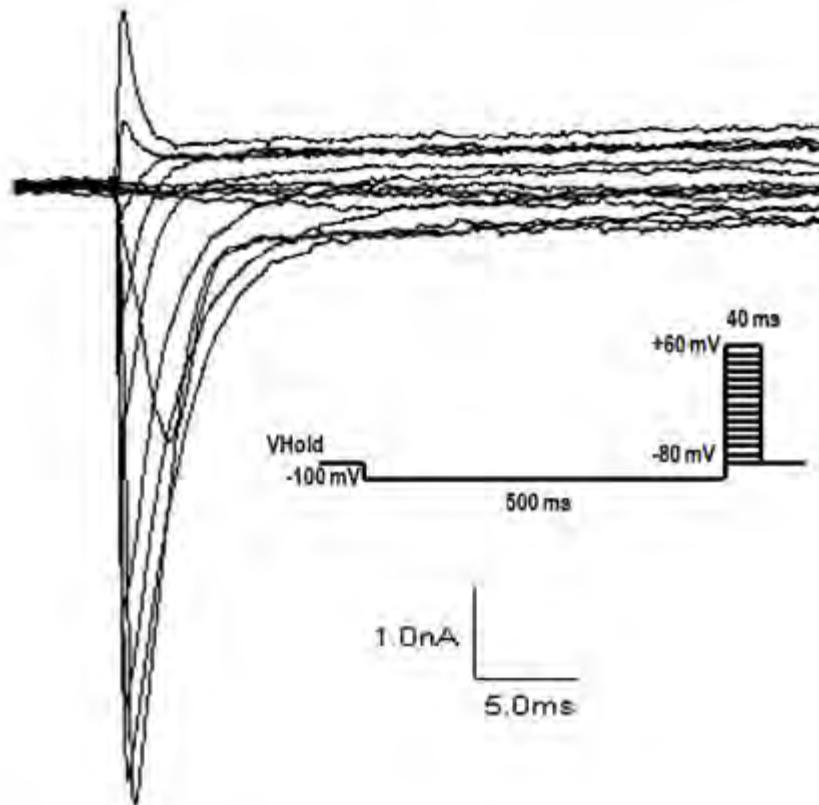
**Gráfico 6 – Avaliação da citotoxicidade de (-)-carvona em células HEK 293.** A viabilidade celular foi determinada por fluorescência ao iodeto de propídio e quantificado por citometria de fluxo, após 6h de tratamento, e em seguida normalizada à partir dos níveis de absorbância do grupo controle. Doxorubicina (DOXO, 50  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo. Valores expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=3; duplicata;  $1 \times 10^5$  células/mL). \*\*p< 0,01; \*\*\*p< 0,001; ANOVA seguido do teste de Dunnet.

### **4.3 Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais de sódio dependentes de voltagem**

Por meio da técnica de *Patch-clamp*, no modo *Whole-cell*, foi possível isolar correntes totais de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}^+}$ ) em neurônios DRG e dessa forma investigar o efeito de (-)-carvona diretamente sobre os canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ). Para tanto, realizou-se inicialmente a identificação dessas correntes bem como o estabelecimento da relação corrente/voltagem.

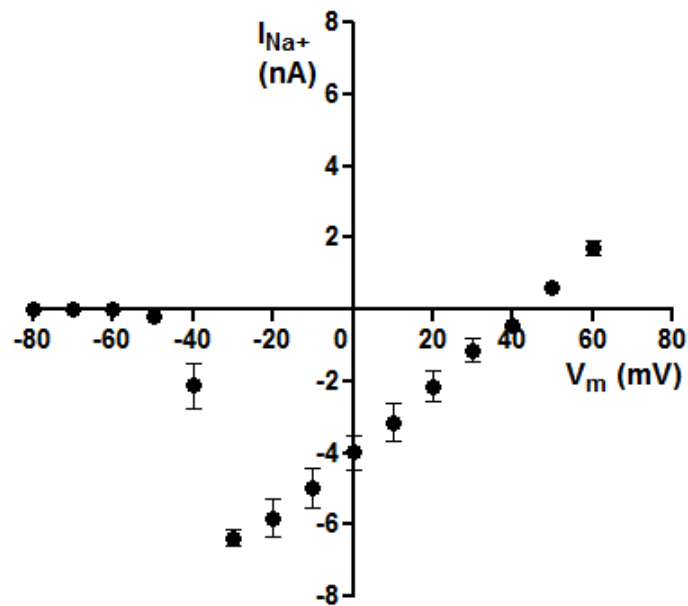
#### **4.3.1 Isolamento de correntes totais de $\text{Na}^+$ em neurônios DRG**

Nestes experimentos, foi avaliada a dependência de voltagem dos canais de  $\text{Na}^+$ , com a finalidade de caracterizar as correntes de  $\text{Na}^+$  totais em neurônios DRG, e com isso determinar uma voltagem de membrana adequada para induzir a ativação dos canais  $\text{Na}_v$ . Para tanto, realizou-se um protocolo de pulso onde um pré-pulso de -100mV/500 ms era aplicado antes dos pulsos-teste, com a finalidade de manter a população dos canais  $\text{Na}_v$  em seu estado fechado. A partir de então, foram aplicados pulsos que variavam de -80 a +60 mV/40 ms, com incremento de 10 mV entre cada pulso (Figura 25).



**Figura 25 – Caracterização das correntes totais de Na<sup>+</sup> em neurônios DRG.** Registros representativos das correntes de entrada de Na<sup>+</sup> geradas em neurônios DRG. A direita está representado o protocolo de pulso utilizado, a partir de um *holding* de -80 mV. O pré-pulso de -100 mV/500 ms foi aplicado antes dos pulsos-teste que variavam de -80 a +60 mV/40 ms, em incremento de 10 ms. Frequência de amostragem= 40 kHz. HEKA EPC 10 (Alemanha).

Como esperado, foram observadas correntes totais em torno de 7 nA (Figura 25), a partir das quais foi possível construir o gráfico I/V, que relaciona os valores de corrente geradas em função da voltagem de membrana fixada (*clamped*). De acordo com o gráfico 7, pode-se observar um traçado característico de canais Na<sub>v</sub> (Hille, 2001), cuja corrente máxima se dá entre -20 e -10 mV e seu potencial de reversão (E<sub>R</sub>) em torno de +45 mV.



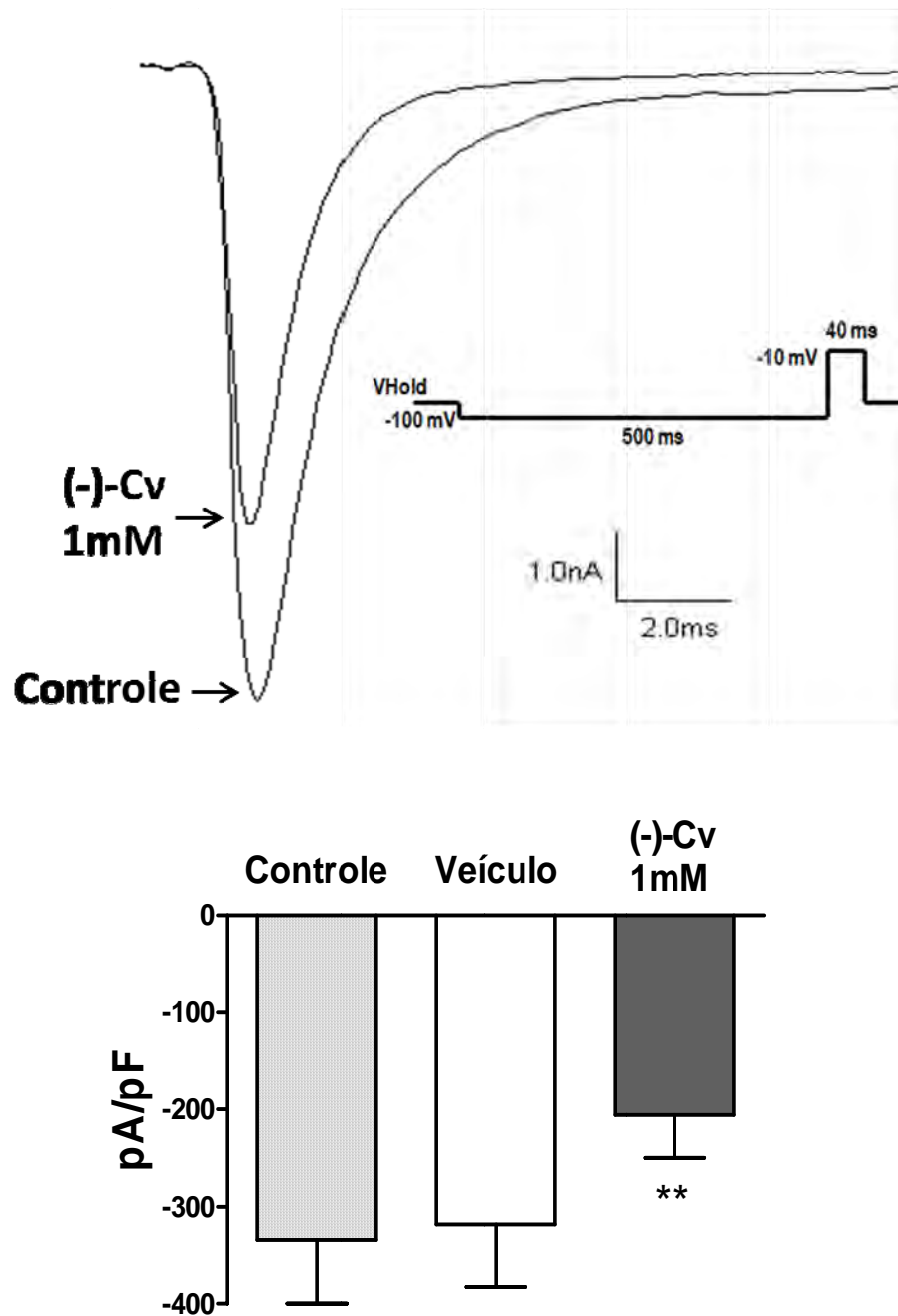
**Gráfico 7 – Relação corrente/voltagem de canais  $Na_v$  em neurônios DRG.** Os pontos representam as médias das correntes geradas em função da voltagem de membrana. Dados expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n= 3). Frequência de amostragem= 40 kHz. EPC 10 (Heka, Alemanha).

#### 4.3.2 Efeito de (-)-carvona sobre as correntes totais de $Na^+$ em neurônios DRG

Após caracterizar as correntes de  $Na^+$  em neurônios DRG, realizou-se um protocolo de pulso que objetivou isolar correntes individuais, e com isso investigar o efeito de (-)-carvona diretamente sobre os canais  $Na_v$ .

De acordo com o protocolo mostrado na figura 26, foram obtidas no controle correntes médias de  $8,7\pm 1,6$  nA, logo após o estabelecimento da configuração *Whole-cell* nessas células. Em 3 min de perfusão com (-)-carvona (1 mM) diretamente sobre a célula selecionada, observou-se que a amplitude da corrente era reduzida para  $5,3\pm 1,1$  nA ( $p < 0,05$ ). Quando apenas o veículo (DMSO 0,1 %) era perfundido nas mesmas condições, nenhuma alteração significativa dessas correntes foi observada.

O gráfico da figura 26 demonstra esses experimentos, no entanto, com os valores de corrente de  $Na^+$  normalizadas pela capacitância dos neurônios DRG de pequeno diâmetro utilizados (CUMMINS et al., 2009; HUANG; SONG, 2008).

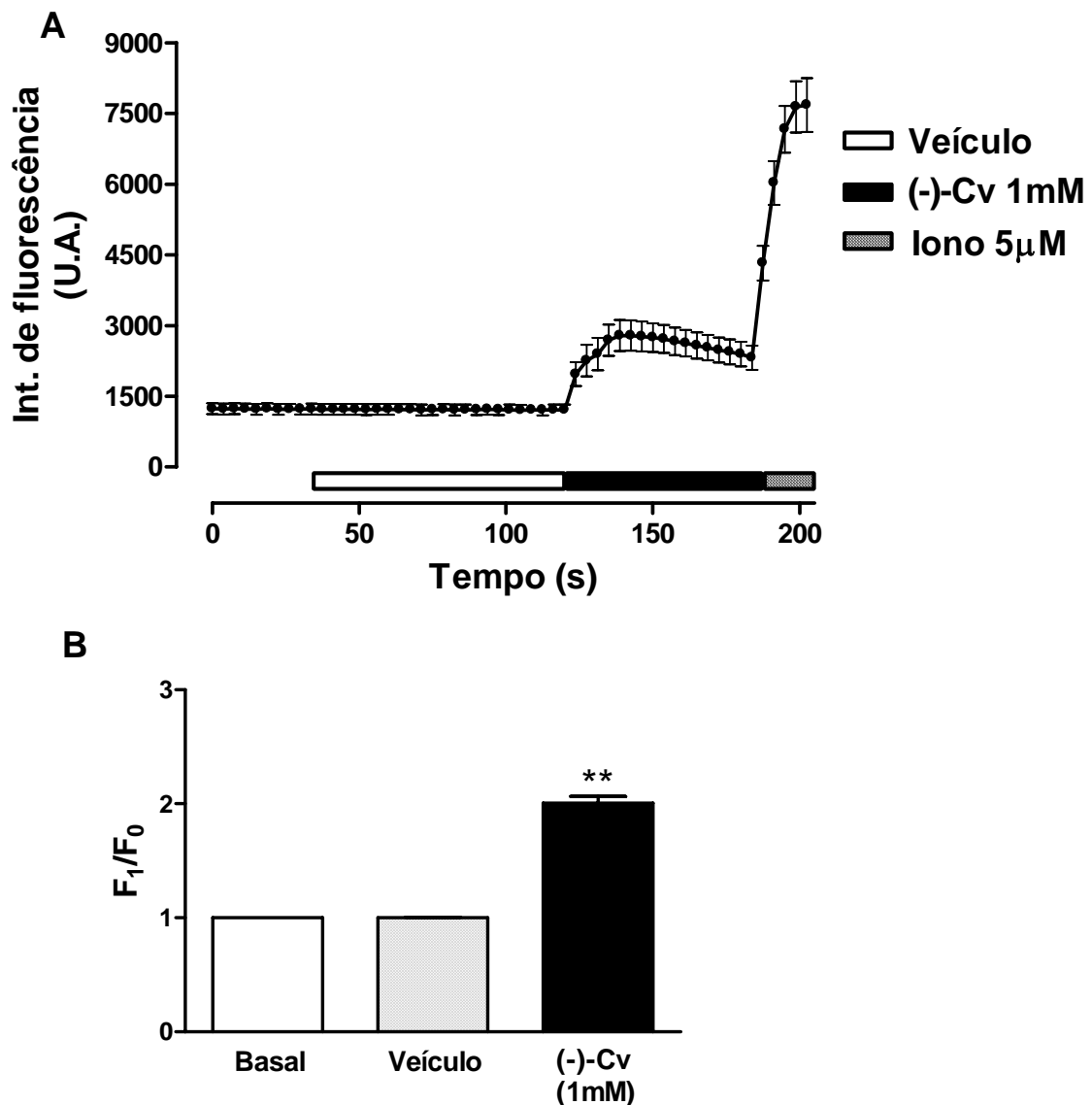


**Figura 26 – Efeito de (-)-carvona sobre as correntes totais de Na<sup>+</sup> em neurônios DRG.** Acima observam-se registros representativos das correntes de Na<sup>+</sup> geradas em neurônios DRG, nas situações controle e após perfusão com (-)-carvona (1 mM). A direita desta figura está o protocolo de pulso utilizado, a partir de um  *Holding* de -80 mV. O pré-pulso de -100 mV/500 ms foi aplicado antes do pulso-teste (-10 mV/40 ms). O gráfico abaixo mostra as correntes normalizadas pela capacitância, nas situações controle e após perfusão pelo veículo (DMSO 0,1 %) e (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM). Dados expressos como a média±e.p.m. (n= 4). \*\*p< 0,01 vs controle; Teste “t” de Student.

#### 4.4 Investigação dos efeitos de (-)-carvona sobre os níveis de $\text{Ca}^{2+}$ em neurônios DRG

Durante os ensaios de monitoramento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares em neurônios DRG por microscopia de fluorescência, foi investigado se (-)-carvona era capaz de induzir alterações na fluorescência emitida pelo Fluo-3/AM (Ex488; Em515 nm) nessas células.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que (-)-carvona (1 mM) aumentava a intensidade de fluorescência segundos após a sua aplicação, em neurônios DRG de 15–30  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Gráfico 8-A). Entretanto, nenhuma variação foi observada quando o veículo era incubado nas mesmas condições (Gráfico 8-A). Ionomicina (5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada para induzir o aumento total de  $\text{Ca}^{2+}$  nessas células. O gráfico 8-B demonstra, quantitativamente, a variação da fluorescência relativa ( $F_1/F_0$ ) obtida a partir dos níveis basais ( $F_0$ ). (-)-Carvona (1 mM) duplicou os níveis de fluorescência relativa de  $1,0 \pm 0,0$  para  $2,0 \pm 0,6$ , enquanto que o veículo não foi capaz de induzir qualquer variação.

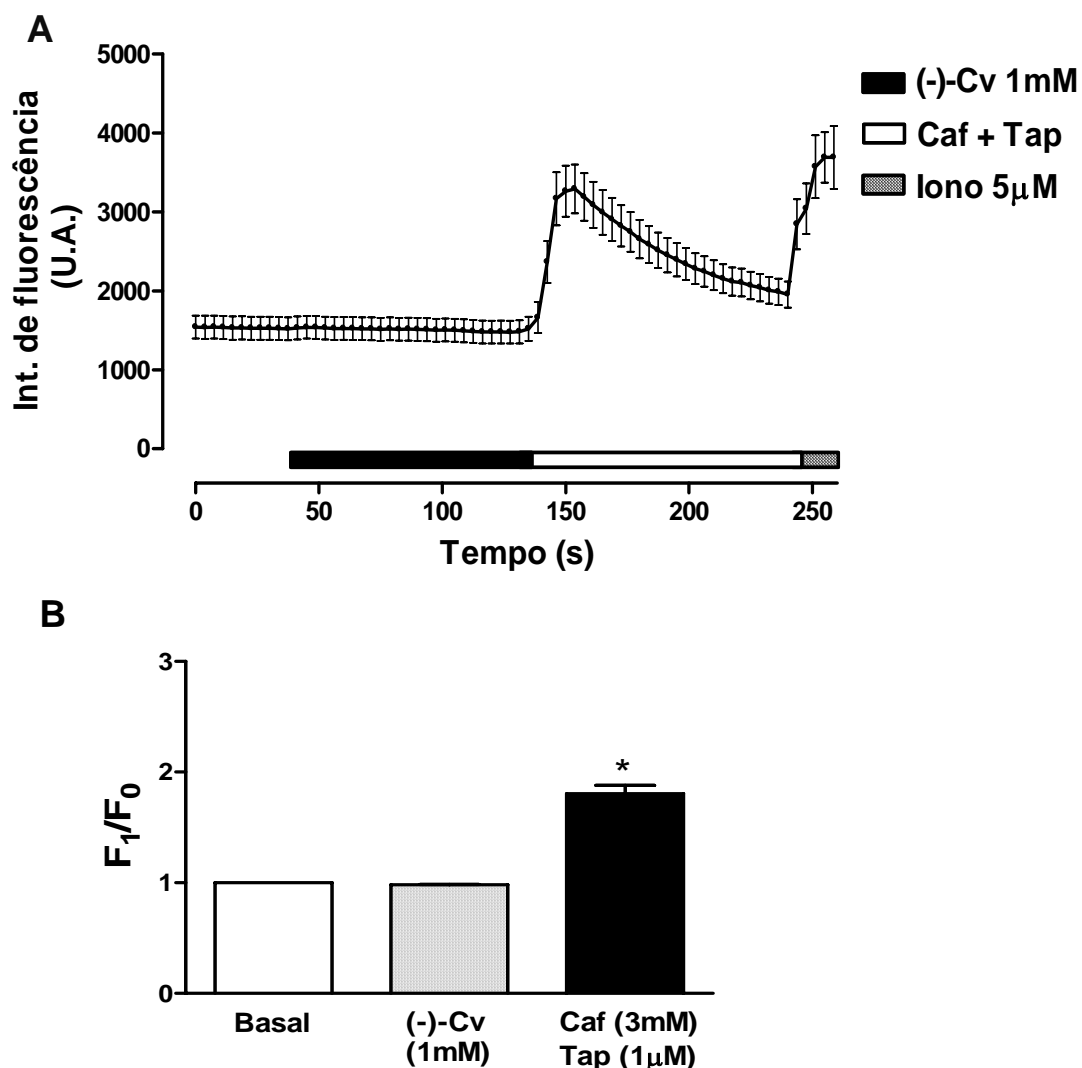


**Gráfico 8 – Efeito de (-)-carvona sobre os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios DRG.** A. Variação da intensidade de fluorescência do Fluo-3 (Ex488; Em515 nm) em unidades de absorvância (U.A.), como função do tempo de incubação pelo veículo, (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM) e ionomicina (Iono, 5  $\mu\text{M}$ ). B. Variação quantitativa da fluorescência relativa ( $F_1/F_0$ ) a partir dos níveis basais ( $F_0$ ). Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 3$ ; duplicata;  $\sim 12$  células/campo). \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA seguido de teste de Dunnet.

#### 4.4.1 Influência do $\text{Ca}^{2+}$ interno e externo sobre o efeito de (-)-carvona

Esses ensaios foram propostos para investigar se o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos em neurônios DRG, promovidos por (-)-carvona, eram provenientes do meio externo ou dos estoques intracelulares. Com esta finalidade, neurônios DRG (15–30  $\mu\text{m}$ ) foram submetidos à solução de banho zero- $\text{Ca}^{2+}$ ,

acrescida de EGTA (10 mM). Adicionalmente, uma solução de cafeína e tapsigargina foi utilizada como controle positivo, para induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques (BOURON, 2010; CHENG et al., 2010; GIBON; TU; RANKOVIC et al., 2010). Durante esses experimentos foi observado que (-)-carvona (1 mM) não foi capaz de provocar o aumento da fluorescência em neurônios DRG incubados em banho zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Conforme esperado, a solução de cafeína (3 mM) e tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ) aumentou a fluorescência nessas mesmas células (Gráfico 9-A). O gráfico 9-B demonstra quantitativamente tais resultados.

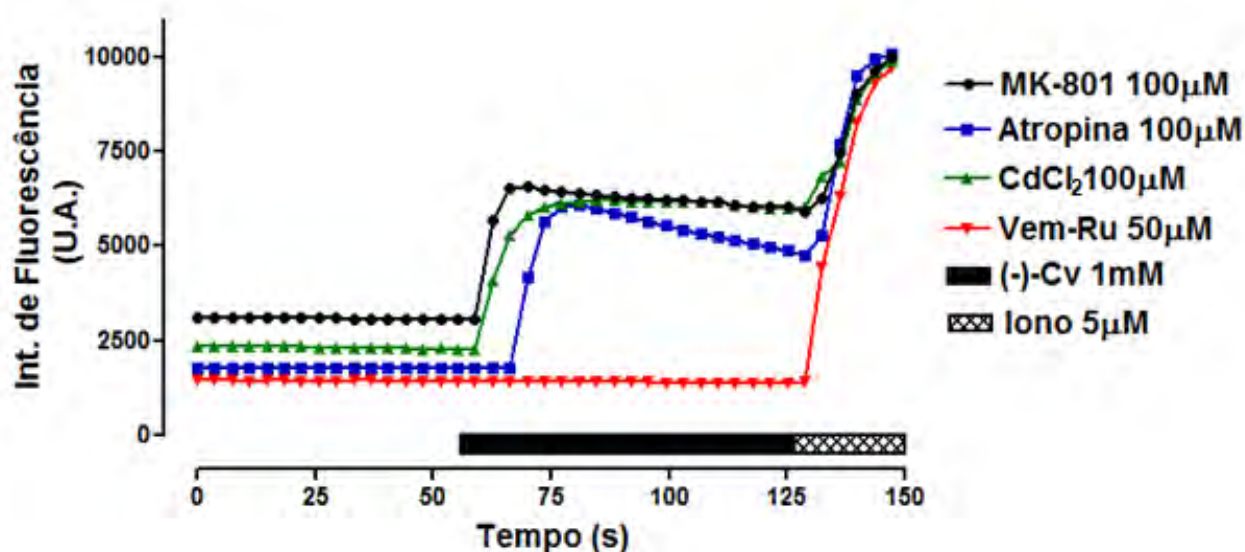


**Gráfico 9 – Influência do  $\text{Ca}^{2+}$  externo sobre os efeitos de (-)-carvona em neurônios DRG.** A. Variação da intensidade de fluorescência do Fluo-3 (Ex488; Em515 nm) em unidades de absorbância (U.A.), como função do tempo de incubação por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM), cafeína (Caf, 3 mM) + tapsigargina (Tap, 1  $\mu\text{M}$ ) e ionomicina (Iono, 5  $\mu\text{M}$ ). B. Variação quantitativa da fluorescência relativa ( $F_1/F_0$ ) a partir dos níveis basais ( $F_0$ ). Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. ( $n=3$ ; duplicata;  $\sim 12$  células/campo). \* $p < 0,05$ ; ANOVA seguido de teste de Dunnet.

#### 4.4.2 Investigação dos receptores envolvidos no efeito de (-)-carvona

Inicialmente foi realizado um *screening* farmacológico com o objetivo de avaliar a participação de alguns dos principais receptores envolvidos na nocicepção, expressos em neurônios DRG e que possam estar envolvidos no aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por (-)-carvona nessas células. Para isso foram utilizados bloqueadores como o  $\text{CdCl}_2$  (canais  $\text{Ca}_v$ ), atropina (muscarínicos), MK-801 (NMDA e nicotínicos) e o vermelho de rutênio (canais TRP) (HILLE, 2001; MIYANO et al., 2009; OHSHIRO; OGAWA; SHINJO, 2007).

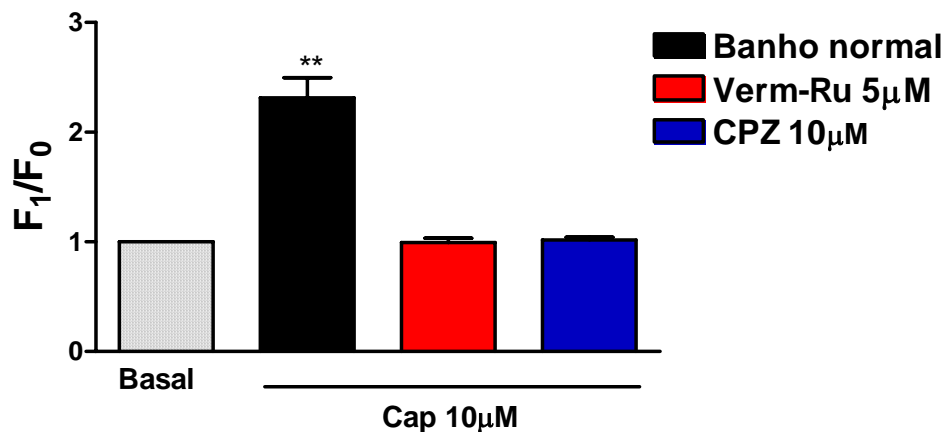
De acordo com os resultados obtidos quando  $\text{CdCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ), atropina (100  $\mu\text{M}$ ), MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ) e vermelho de rutênio (50  $\mu\text{M}$ ) eram incubados por 5 min, separadamente, antes dos experimentos, verificou-se que apenas este último bloqueador era capaz de reduzir o efeito de (-)-carvona sobre o aumento da fluorescência pelo  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios DRG (Gráfico 10).



**Gráfico 10 – Investigação dos receptores envolvidos no efeito de (-)-carvona sobre os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios DRG.** Variação da intensidade de fluorescência do Fluo-3 (Ex488; Em515 nm) em unidades de absorvância (U.A.), como função do tempo de incubação por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM) e ionomicina (Iono, 5  $\mu\text{M}$ ) incubadas em células tratadas com MK-801, atropina,  $\text{CdCl}_2$ , Verm-Ru (n= 1–2; ~15 células/campo).

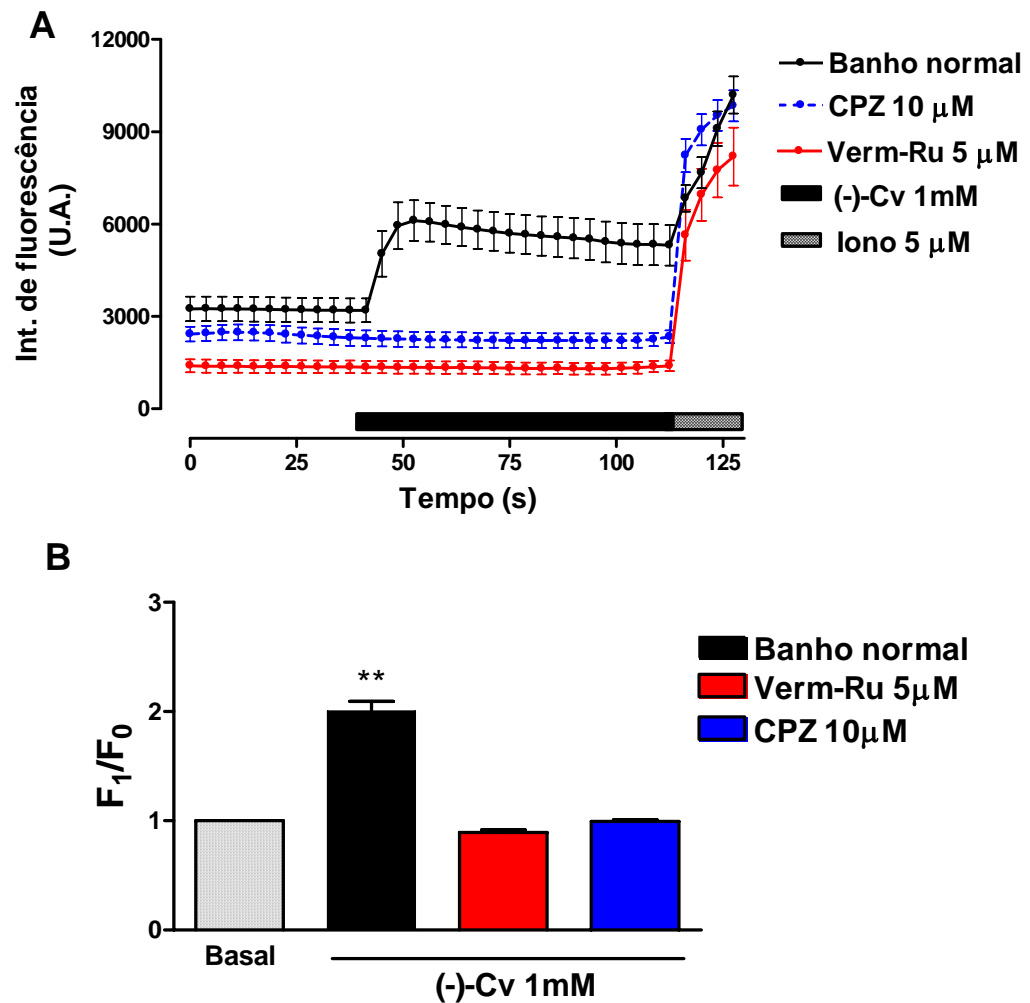
A partir de então foram realizados experimentos adicionais utilizando-se bloqueadores de canais TRP inespecífico, como o vermelho de rutênio (Verm-Ru), e

seletivo para canais TRPV1 como a capsazepina (CPZ) (SZALLASI et al., 2007). A capsaicina foi utilizada como controle-positivo para ativar TRPV1 (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Como esperado, a capsaicina (10  $\mu$ M) aumentou a fluorescência relativa de  $1,0\pm 0,0$  (basal) para  $2,4\pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ) e esse efeito foi totalmente bloqueado para  $1,0\pm 0,04$  e  $1,1\pm 0,02$  por Verm-Ru (5  $\mu$ M) e CPZ (10  $\mu$ M), respectivamente (Gráfico 11).



**Gráfico 11 – Bloqueio do efeito da capsaicina em neurônios DRG por antagonismo do canal TRPV1.** Efeito da capsaicina (Cap, 10  $\mu$ M) sobre variação quantitativa da fluorescência relativa ( $F_1/F_0$ ) a partir dos níveis basais ( $F_0$ ) em células submetidas ao banho normal ou CPZ (10  $\mu$ M). Valores expressos como a média $\pm$ e.p.m. ( $n = 3$ ; duplicata;  $\sim 12$  células/campo). \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA seguido de teste de Tukey.

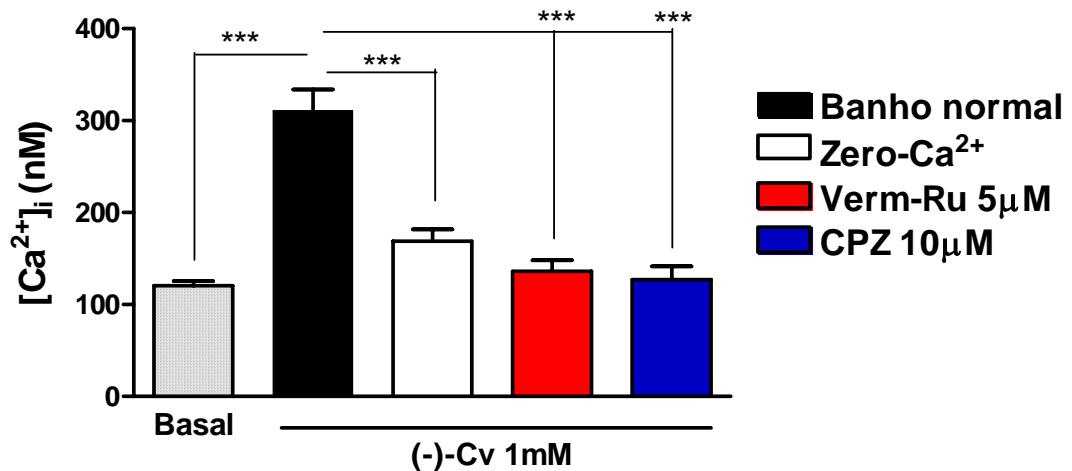
A incubação prévia dos neurônios DRG por Verm-Ru (5  $\mu$ M) e CPZ (10  $\mu$ M) por 5 min, foram capazes de bloquear totalmente o efeito de (-)-carvona sobre o aumento da fluorescência pelo  $Ca^{2+}$  nessas células (Gráfico 12-A). Como demonstrado anteriormente, (-)-carvona (1 mM) novamente duplicou os níveis de fluorescência relativa de  $1,0\pm 0,0$  (basal) para  $2,0\pm 0,9$  ( $p < 0,05$ ), no entanto este efeito foi totalmente bloqueado para  $0,9\pm 0,02$  e  $1,0\pm 0,03$  por Verm-Ru (5  $\mu$ M) e CPZ (10  $\mu$ M), respectivamente (Gráfico 12-B).



**Gráfico 12 – Bloqueio do efeito de (-)-carvona em neurônios DRG pelo vermelho de rutênio (Verm-Ru) e capsazepina (CPZ).** A. Variação da intensidade de fluorescência do Fluo-3 (Ex488; Em515 nm) em unidades de absorvância (U.A.), como função do tempo de incubação por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM) e ionomicina (Iono, 5 μM) incubadas em células submetidas ao banho normal ou CPZ (10 μM). B. Variação quantitativa da fluorescência relativa ( $F_1/F_0$ ) a partir dos níveis basais ( $F_0$ ). Valores expressos como a média±e.p.m. (n= 3; duplicata; ~12 células/campo). \*\*p<0,01; ANOVA seguido de teste de Tukey.

As medidas de fluorescência pelo Fluo-3/AM, permitem determinar com grande precisão a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), através da equação:  $[Ca^{2+}]_i = Kd * (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$  inicialmente proposta por Grynkiewicz e col. (1985), onde  $Kd$  é a constante de dissociação do Fluo-3/AM de 450 nM;  $F$  é a fluorescência emitida;  $F_{max}$  e  $F_{min}$  representam as fluorescências máxima e mínima, obtidas após incubação por ionomicina 5 μM e EGTA 20 mM, respectivamente (MARTINS et al., 2008).

A partir de então foi possível determinar  $[Ca^{2+}]_i$  em neurônios DRG antes e após tratamento com (-)-carvona. De acordo com o gráfico 13, podemos observar que os níveis basais de  $Ca^{2+}$  nesses neurônios ( $120,6 \pm 5,0$  nM) aumentaram para  $310,7 \pm 23,1$  nM ( $p < 0,001$ ) após adição de (-)-carvona (1 mM). Como descrito acima, tal efeito foi completamente abolido para  $168,9 \pm 13,0$  nM;  $136,1 \pm 12,2$  nM e  $127,2 \pm 14,1$ , quando as células eram submetidas respectivamente ao banho com zero- $Ca^{2+}$ , Verm-Ru ( $5 \mu M$ ) ou CPZ ( $10 \mu M$ ).



**Gráfico 13 – Efeito de (-)-carvona sobre as concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$  em neurônios DRG.** Gráfico quantitativo da variação da concentração do  $Ca^{2+}$  intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  induzido por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM) em células submetidas ao banho normal ou zero- $Ca^{2+}$  ou pré-incubadas por vermelho de rutênio (Verm-Ru,  $5 \mu M$ ) ou capsazepina (CPZ,  $10 \mu M$ ). Os valores foram obtidos pela equação:  $[Ca^{2+}]_i = K_d * (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ . Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 3$ ; duplicata;  $\sim 12$  células/campo). \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA seguido de teste de Tukey.

#### 4.6 Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2

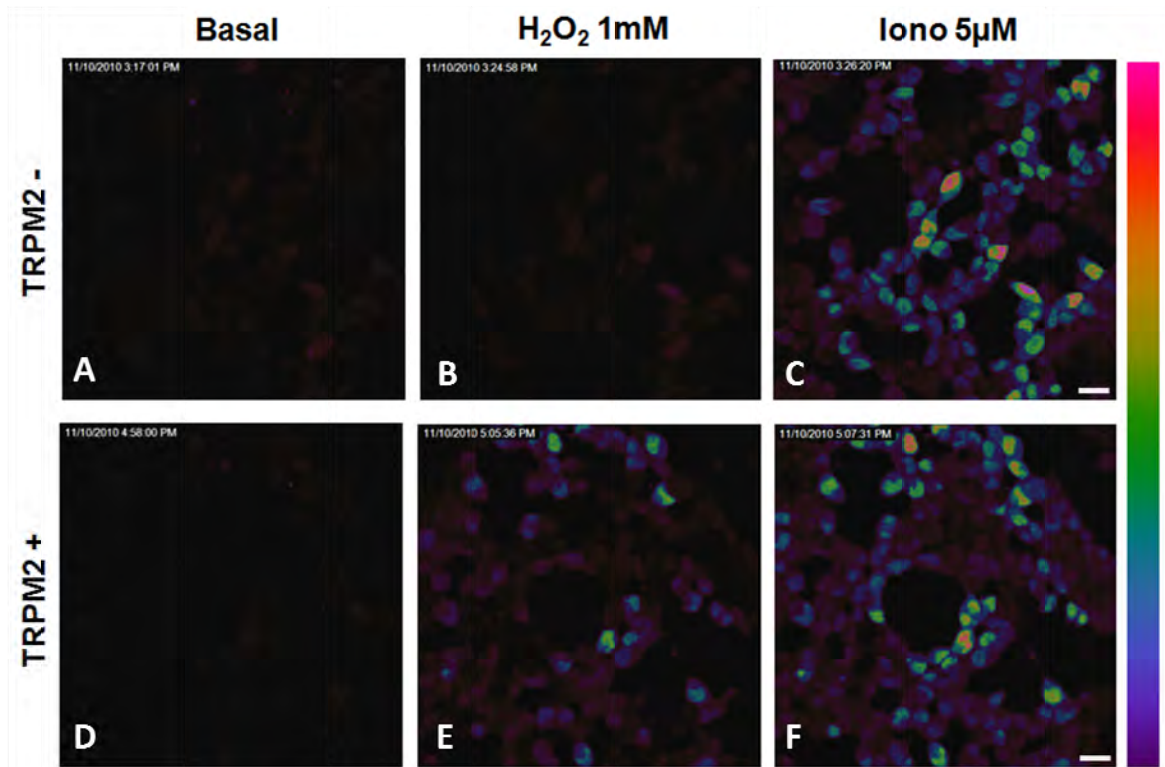
Em um estudo recente, Sozbir e col. (2011) sugeriram que a ativação dos canais TRPM2 em neurônios DRG está relacionada com a indução de processos inflamatórios como consequência do estresse oxidativo, dessa forma contribuindo para a etiologia da dor neuropática. Com base nesses dados, investigou-se a

possibilidade da (-)-carvona estar relacionada com o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via canais TRPM2.

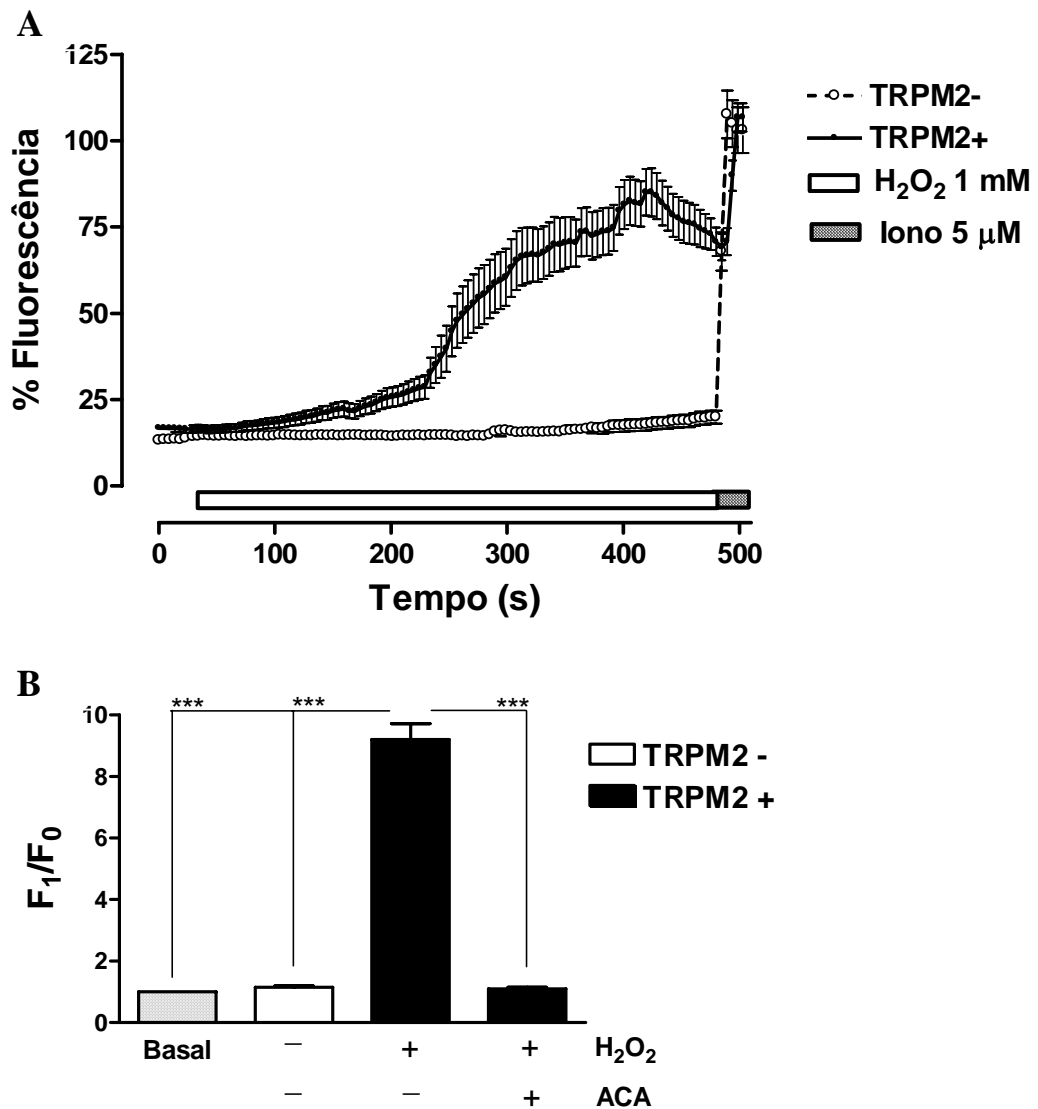
Foram então realizados experimentos de microscopia confocal em células HEK 293 estavelmente transfectadas com o cDNA para o canal TRPM2 (T-REx/TRPM2), observando-se as variações de fluorescência do marcador para  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-3/AM (Ex488; Em515 nm). A expressão desses canais podia ser induzida ou não nessas células pela doxiciclina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incubada por 12–24h antes dos ensaios, enquanto que a sua ativação era feita por pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (KRAFT et al., 2004; 2006).

Inicialmente realizaram-se testes controle, para confirmar a expressão dos canais TRPM2 pelas células T-REx/TRPM2 (Figura 27). No grupo não tratado com doxiciclina (TRPM2-), não foi observado alteração na fluorescência, enquanto que as células tratadas (TRPM2+) exibiram um grande aumento da mesma, que foi de  $1,0 \pm 0,0$  (basal) para  $9,2 \pm 0,5$  em aproximadamente 5 min de incubação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) (Gráfico 14). Como descrito previamente por Kraft e col. (2006), esse efeito foi totalmente bloqueado para os níveis de fluorescência basais ( $1,1 \pm 0,05$ ) quando o ácido N-(*p*-amylcinnamoyl) antranílico (ACA, 20  $\mu\text{M}$ ) foi incubado 5 min antes do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) (Gráfico 14-B).

Ionomicina 5  $\mu\text{M}$  foi utilizada no final de cada experimento com a finalidade de induzir a fluorescência máxima (Figura 27).



**Figura 27 – Indução da expressão de canais TRPM2 em células T-REx.** Imagens obtidas por microscopia confocal usando-se o marcador Fluo-3/AM (Ex488; Em515 nm), em células cuja expressão dos canais foi induzida (TRPM2+, D–F) ou não (TRPM2-, A–C) por doxiciclina (1 µg/mL/12–24h). Os níveis basais de fluorescência foram obtidos quando nenhuma droga era incubada e logo após adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) por 7 min. A fluorescência máxima foi observada com ionomicina (Iono 5 µM).

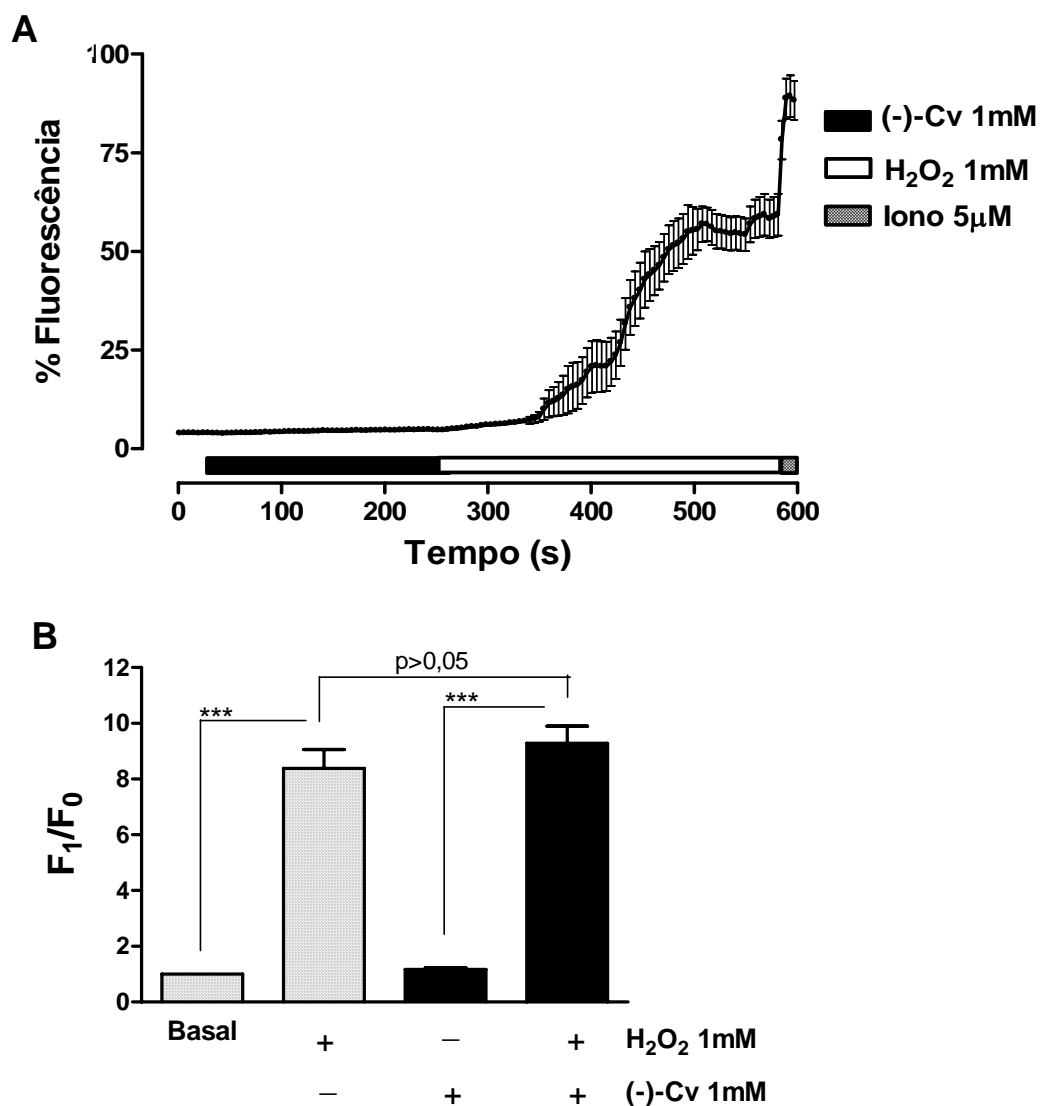


**Gráfico 14 – Expressão de canais TRPM2 em células T-REx/TRPM2.** A. Variações na % de fluorescência pelo Fluo-3/AM (Ex488; Em515 nm) em células cuja expressão desses canais era induzida (TRPM2+) ou não (TRPM2-) por doxiciclina (1 μg/mL/12–24h). Solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) e ACA (20 μM) foram utilizadas como drogas-controle para ativação e bloqueio de TRPM2, respectivamente. B. Quantificação da fluorescência relativa (F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>) a partir dos níveis basais (F<sub>0</sub>). Valores expressos como a média±e.p.m. (n=2/~20 células/campo). \*\*\*p<0, 001; ANOVA seguido de teste de Tukey.

A partir de então foi possível avaliar o efeito de (-)-carvona nesses canais. O Gráfico 15-A demonstra que (-)-carvona (1 mM) não produz qualquer efeito significativo sobre os níveis de fluorescência decorrentes do influxo de Ca<sup>2+</sup> em células T-REx expressando TRPM2. Vale ressaltar que nenhuma alteração na fluorescência foi observada quando o veículo foi incubado em células TRPM2+, ou

mesmo por (-)-carvona (1 mM) quando incubada em células TRPM2- (dados não mostrados).

Logo após a incubação por (-)-carvona em células TRPM2+, adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) para confirmar se essas células estavam de fato expressando esses canais, ou ainda, para investigar se este monoterpene poderia estar na verdade reduzindo o influxo de Ca<sup>2+</sup> via TRPM2. Observou-se que (-)-carvona não foi capaz de promover qualquer efeito significativo no aumento da fluorescência relativa (F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>) induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (Gráfico 15-B).



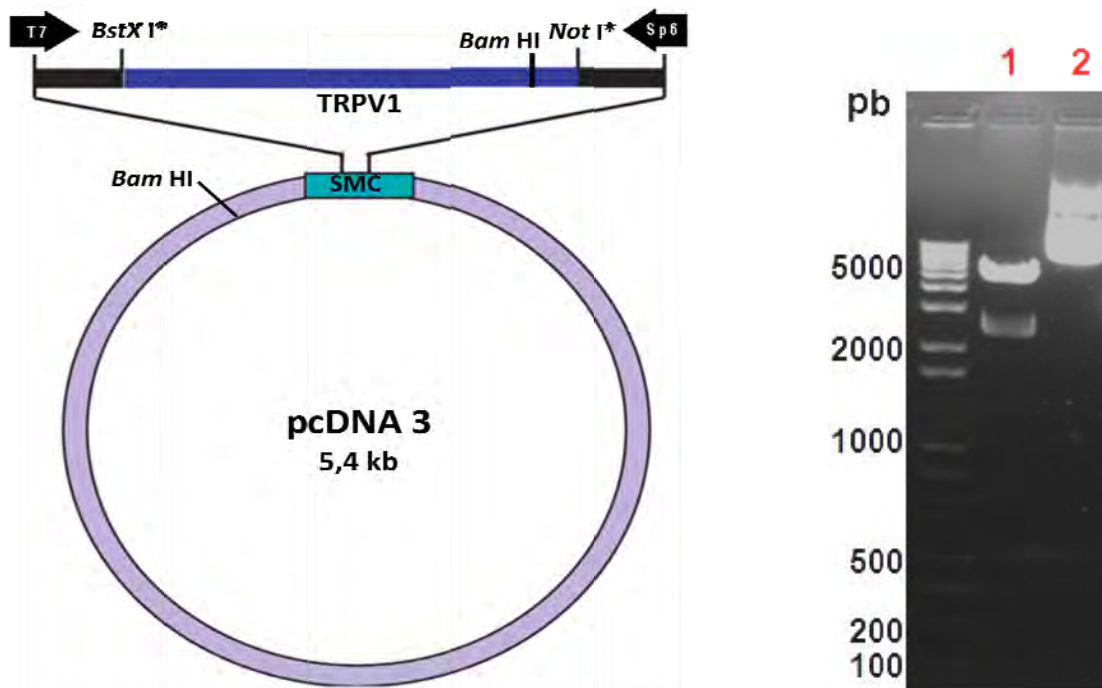
**Gráfico 15 – Investigação do efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPM2.** A. Variações na % de fluorescência pelo Fluo-3/AM (Ex488; Em515 nm) em células T-REx expressando canais TRPM2, após incubação por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) e ionomicina (Iono, 5 μM). B. Quantificação da fluorescência relativa (F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>) a partir dos níveis

basais ( $F_0$ ). Valores expressos como a média $\pm$ e.p.m. (n=2-3/~20 células/campo). \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA seguido de teste de Tukey.

#### **4.7 Expressão heteróloga de canais TRPV1 em HEK 293**

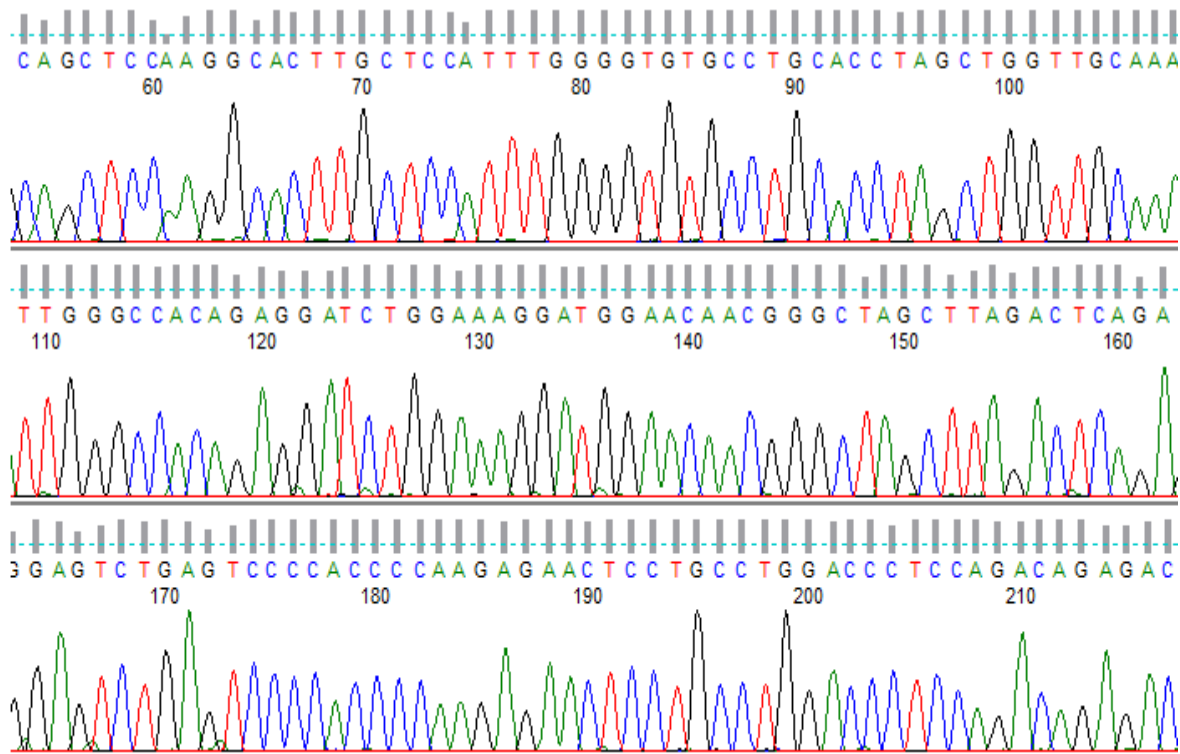
De acordo com os resultados demonstrados com neurônios DRG anteriormente, (-)-carvona elevou a fluorescência mediada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  nessas células, sendo este efeito totalmente bloqueado pelo Verm-Ru e CPZ, indicando o possível envolvimento dos canais TRPV1 (Gráfico 12 e 13). Entretanto, experimentos adicionais foram realizados com o objetivo de confirmar esta hipótese. Investigou-se, portanto, o efeito de (-)-carvona em células HEK 293 expressando o canal TRPV1 heterologicamente, por meio de ensaios de microscopia de fluorescência pelo Fura-2/AM (Ex340/380; Em510 nm), monitorando-se os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares nessas células.

Inicialmente confirmou-se a identidade do DNA complementar (cDNA) do TRPV1, doado pelo Prof. David Julius (UCSF, EUA), por meio de análise de restrição e seqüenciamento. A Figura 28 mostra o mapa de clonagem do cDNA do TRPV1 em pCDNA3, e o seu sítio múltiplo de restrição (CATERINA et al., 1997). O cDNA foi purificado e então submetido à análise de restrição com a enzima *Bam* HI, onde foi possível deduzir a presença do inserto (~3 kb) (Figura 28).



**Figura 28 – Análise de restrição do plasmídeo clonado com TRPV1.** A esquerda, cDNA-TRPV1 que foi clonado no vetor pCDNA3 utilizando-se os sítios *BstX I* e *Not I*. Os asteriscos indicam os sítios de restrição únicos. Na direita, observa-se a eletroforese em gel de agarose (1%) do plasmídeo purificado antes (2) e após a análise de restrição por *Bam HI*.

Posteriormente, realizou-se o sequenciamento do cDNA purificado, utilizando-se o *primer* promotor T7 do London Regional Genomics Center – Robarts Res. Inst., UWO – Canada. Foi obtida portanto, uma sequência de aproximadamente 900 nucleotídeos (Figura 29), o que representa mais de 30 % da sequência total do cDNA-TRPV1 cujo comprimento é de 2847 pares de base (Fonte: NCBI). Analisando-se a sequência obtida pelo programa Megablast do NCBI (nr/nt), observou-se um alto percentual de similaridade (99 %) com o gene do canal TRPV1 de *Rattus norvegicus*. Para esta análise obteve-se 100 % de cobertura, 0 % de *gaps* e Evalue de 0.0 (Figura 29). O resultado do sequenciamento completo, bem como o alinhamento total, podem ser conferidos nos anexos.



GENE ID: 83810 Trpv1 | transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 [Rattus norvegicus] ([Over 100 PubMed links](#))

Score = 1629 bits (882), Expect = 0.0  
 Identities = 885/886 (99%), Gaps = 1/886 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1   CAGCTCCAAGGCACTTGTCTCCATTGGGGTGTGCTTGCACCTAGCTGGTTGCAAATTGGG 60
          |||
Sbjct 1   CAGCTCCAAGGCACTTGTCTCCATTGGGGTGTGCTTGCACCTAGCTGGTTGCAAATTGGG 60

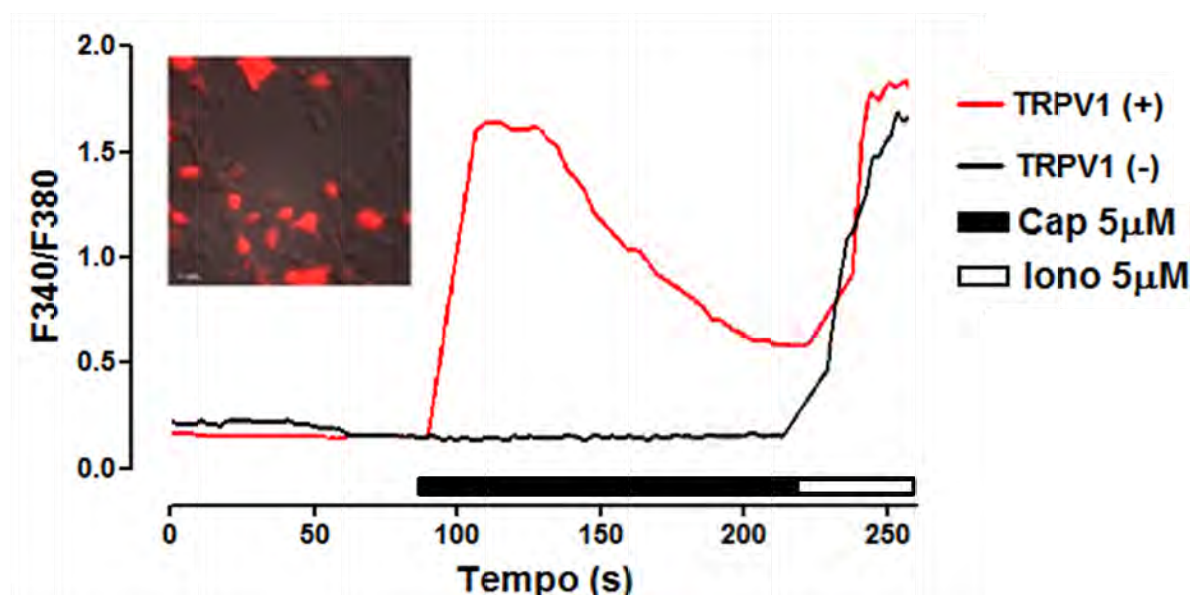
Query 61   CCACAGAGGATCTGGAAAGGATGGAACAACGGGCTAGCTTAGACTCAGAGGAGTCTGAGT 120
          |||
Sbjct 61   CCACAGAGGATCTGGAAAGGATGGAACAACGGGCTAGCTTAGACTCAGAGGAGTCTGAGT 120

Query 121  CCCCACCCCAAGAGAACTCCTGCCTGGACCCTCCAGACAGAGACCCTAACTGCAAGCCAC 180
          |||
Sbjct 121  CCCCACCCCAAGAGAACTCCTGCCTGGACCCTCCAGACAGAGACCCTAACTGCAAGCCAC 180

Query 181  CTCCAGTCAAGCCCCACATCTTCACTACCAGGAGTCGTACCCGGCTTTTTGGGAAGGGTG 240
          |||
Sbjct 181  CTCCAGTCAAGCCCCACATCTTCACTACCAGGAGTCGTACCCGGCTTTTTGGGAAGGGTG 240
  
```

**Figura 29 – Análise da sequência do cDNA-TRPV1 purificado.** Na figura superior observa-se uma representação do eletroferograma obtido após o sequenciamento do cDNA-TRPV1 purificado, utilizando-se o primer promotor T7 (London Regional Genomics Center – Roberts Res. Inst., UWO – Canada). Abaixo está representada uma parte do resultado do alinhamento feito pelo programa Megablast (NCBI) com a sequência do gene do canal TRPV1 de *Rattus norvegicus*.

À partir da confirmação da identidade do gene TRPV1, realizou-se testes controle por microscopia de fluorescência pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando-se o fluoróforo Fura-2, para confirmar a funcionalidade do canal após sua transfecção em células HEK 293. Por meio de co-transfecção com o marcador fluorescente m-Cherry (Ex587; Em610 nm), foi possível selecionar apenas as células que receberam o cDNA de TRPV1. O Gráfico 16 demonstra que apenas as células que receberam o cDNA (TRPV1+), marcadas em vermelho pelo m-Cherry (mCh), foram capazes de responder à capsaicina 5  $\mu\text{M}$ . O mesmo não ocorreu com as células não transfectadas (TRPV1-), comprovando o sucesso da expressão dos canais TRPV1 nesse estudo. Ionomicina 5  $\mu\text{M}$  foi utilizado para induzir a fluorescência máxima nessas células.

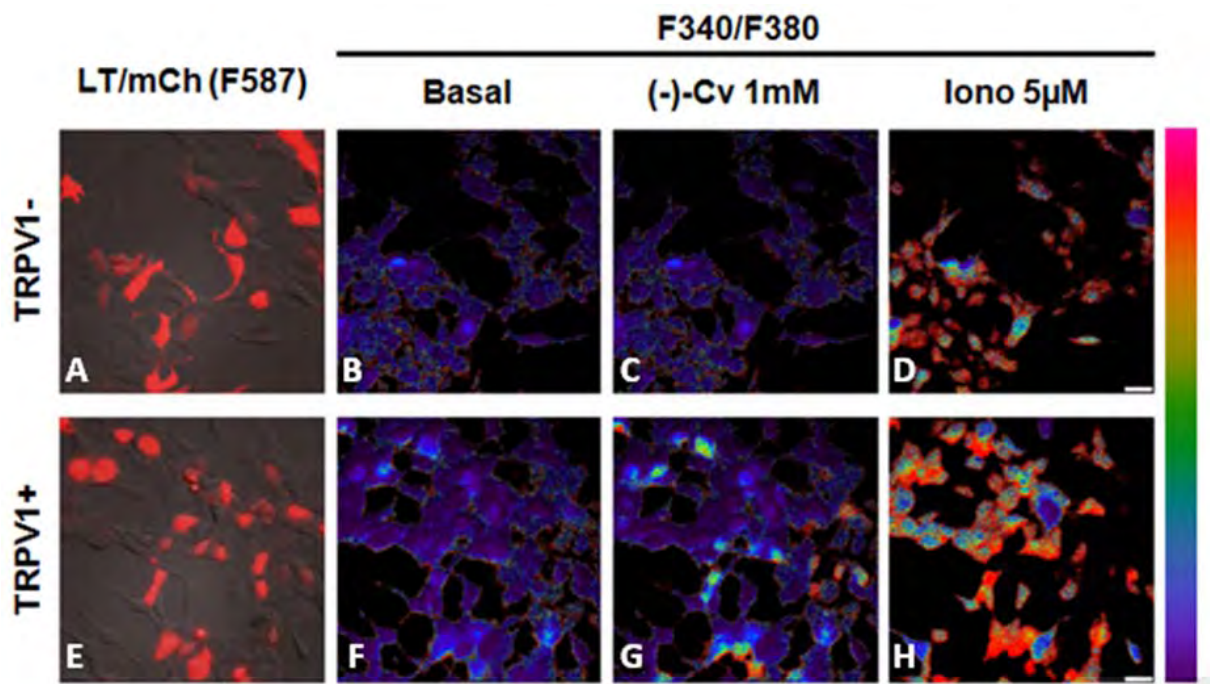


**Gráfico 16 – Expressão heteróloga de canais TRPV1 em células HEK 293.** O traço em negro representada a situação controle por células não transfectadas com o cDNA para canal (TRPV1-) e em vermelho estão as células positivas (TRPV1+). A pequena imagem no canto esquerdo mostra como foram selecionadas apenas as células co-transfectadas com mCh (Ex587; Em610 nm). Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em células marcadas com Fura-2 (Ex 340/380; Em510 nm) 5  $\mu\text{M}$ .

#### 4.7.1 Efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1

Posteriormente foi possível avaliar o efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1. Através das imagens adquiridas durante os experimentos, demonstrou-se

claramente que (-)-carvona 1 mM atua apenas nas células co-transfectadas com o cDNA-TRPV1 e mCh (TRPV1+), ao passo que as células controle negativo, ou seja, que foram transfectadas apenas com mCh (TRPV1-) não tiveram os seus níveis de fluorescência alterados por (-)-carvona sob as mesmas condições (Figura 30).

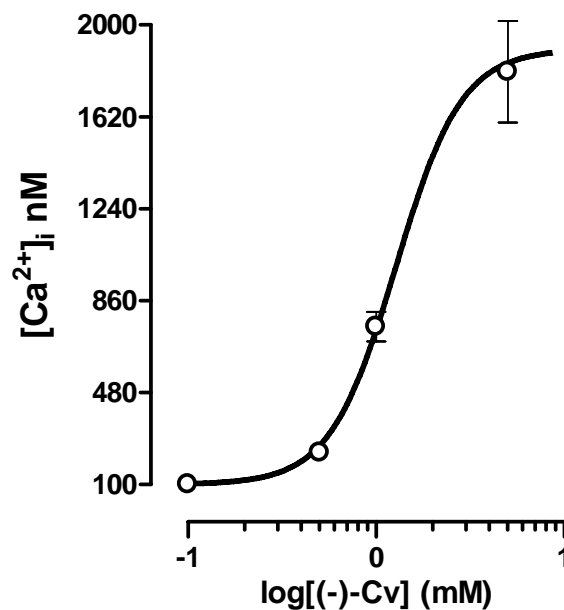


**Figura 30 – Efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 expressos em HEK 293.** Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em células transfectadas (+, E–H) ou não (-, A–D) pelo cDNA-TRPV1, marcadas com Fura-2 (340/380 nm). As imagens da esquerda mostram a superposição entre luz transmitida (LT) e pelo filtro F587 nm correspondente ao mCherry, para identificação das células transfectadas. O basal (B e F) foi obtido quando nenhuma droga era incubada. As imagens C e D foram obtidas 4 min após a adição de (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM). Em D e H observa-se a fluorescência máxima emitida após adição de ionomicina (Iono, 5 µM).

Para quantificar  $[Ca^{2+}]_i$  nas células HEK, utilizou-se a equação de Grynkiewicz e col. (1985),  $[Ca^{2+}]_i = Kd * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{max380} / F_{min380})$ , onde  $Kd$  é a constante de dissociação do Fura-2;  $R$  é a razão F340/F380;  $R_{max}$  e  $R_{min}$  representam a razão máxima e mínima de fluorescência;  $F_{max380}$  e  $F_{min380}$  são a fluorescência máxima e mínima obtidas em F380 nm. A calibração da  $[Ca^{2+}]_{livre}$  foi realizada no final de cada experimento pela ionomicina 5 µM e EGTA 20 mM. A fim de se observar uma possível dependência da concentração dos efeitos de (-)-carvona (1–10 mM) sobre o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em células HEK 293 expressando

TRPV1, os valores obtidos foram aplicados, por regressão não-linear, à equação de Hill  $f=Min+(Max-Min)/1+10^{((\log C_{50}-[droga])^*n)}$ , descrita previamente.

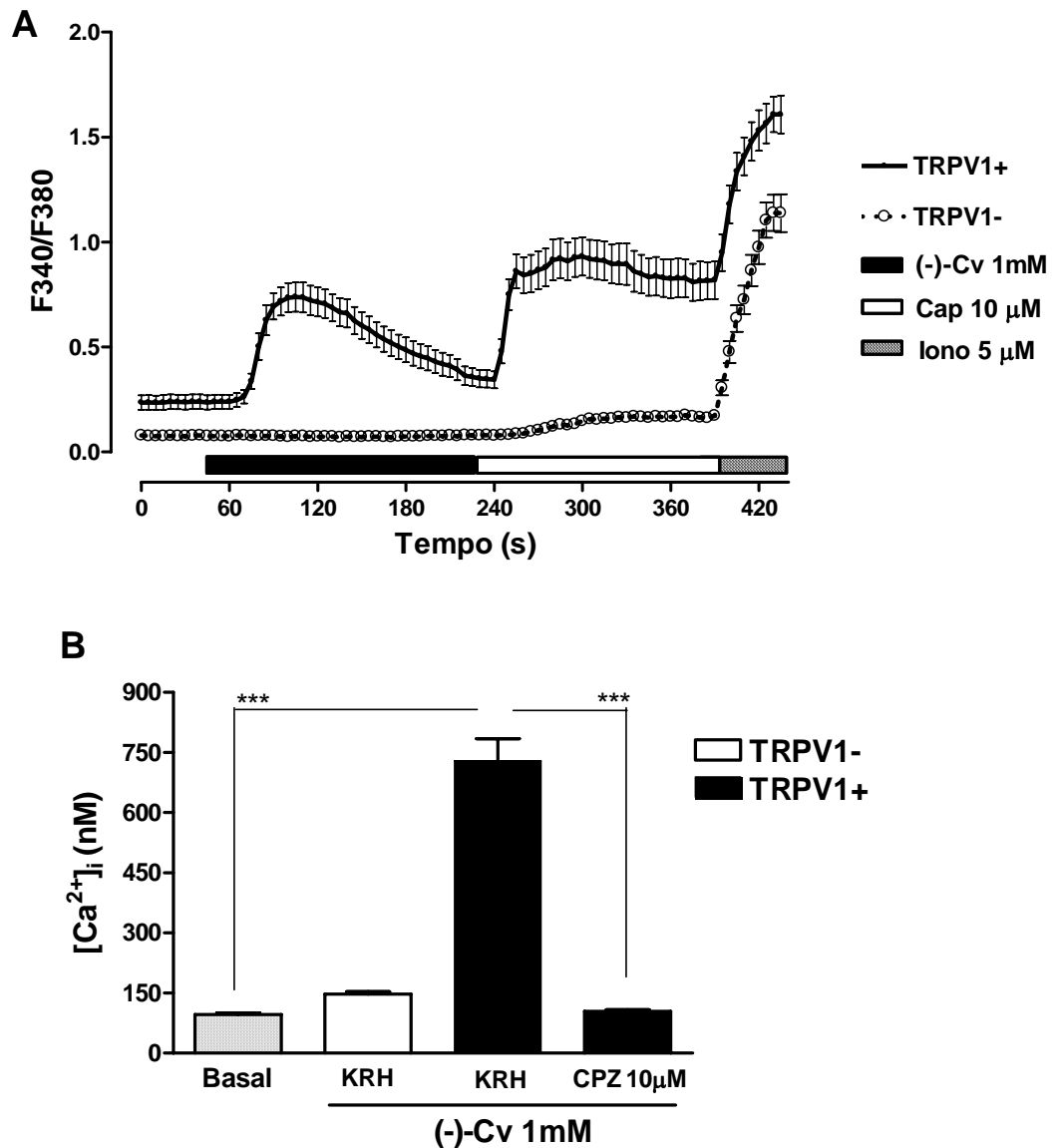
De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 ocorria de modo dependente de sua concentração, apresentando uma  $CE_{50}$  de  $1,3\pm 0,2$  mM e constante de Hill de 2,5, indicando uma possível interação do tipo cooperativa desse monoterpeno com o seu sítio receptor neste canal (Gráfico 17).



**Gráfico 17 – Efeito dependente da concentração de (-)-carvona ((-)-CV) sobre o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  em células HEK transfetadas com TRPV1.** Os valores foram obtidos pela equação:  $[Ca^{2+}]_i = Kd * (R - Rmin) / (Rmax - R) * (Fmax380 / Fmin380)$  e em seguida ajustados à equação de Hill  $f=Min+(Max-Min)/1+10^{((\log C_{50}-[droga])^*n)}$ , por regressão não-linear. Valores expressos como a média ± e.p.m. (n = 3/~15 células/campo).

Em seguida utilizou-se a concentração de (-)-carvona (1 mM), correspondente a sua  $CE_{50}$ , com o objetivo de avaliar o efeito desse monoterpeno frente aos agonistas e bloqueadores do canal TRPV1, capsaicina e capsazepina (CPZ) respectivamente. Com esses experimentos observou-se que (-)-carvona 1mM elevou a razão de fluorescência apenas nas células TRPV1+ (Gráfico 18-A), o que representou um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  de  $96,6\pm 3,7$  nM (basal) para  $729,0\pm 55,2$  nM ( $p < 0,05$ ) em células sob banho normal (KRH), o que foi totalmente bloqueado para  $104,7\pm 3,9$  nM nas células pré-tratadas com CPZ 10  $\mu$ M (Gráfico 18-B). Capsaicina 5

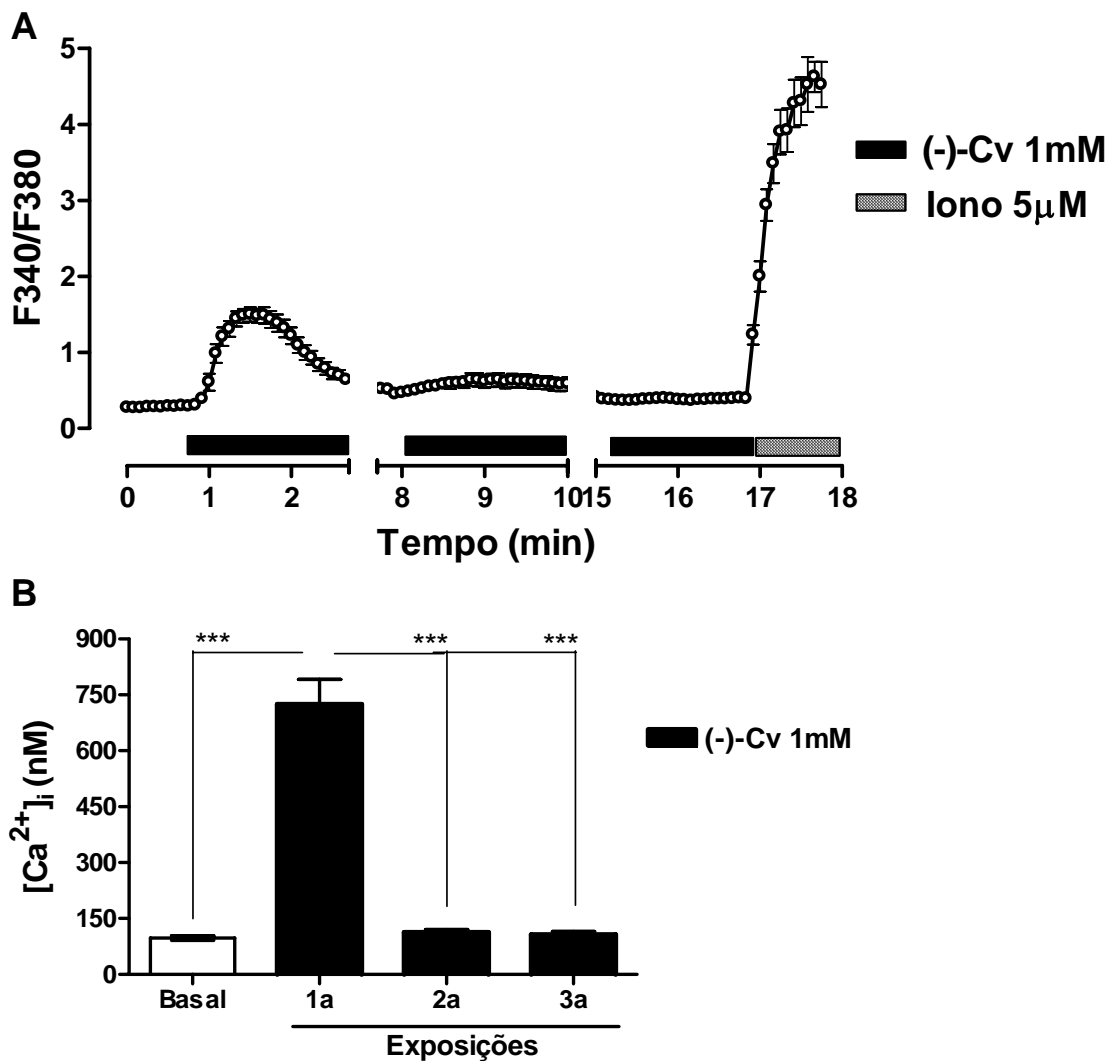
$\mu\text{M}$  foi adicionada logo após (-)-carvona, com o intuito de comprovar a presença ou ausência desses canais nas células TRPV1+ e TRPV1-, respectivamente (Gráfico 18).



**Gráfico 18 – Bloqueio do efeito de (-)-carvona em HEK 293 expressando TRPV1.** A. Gráfico representativo da variação da taxa de fluorescência (F340/F380) frente à incubação por (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM), capsaicina (Cap, 10  $\mu\text{M}$ ) e ionomicina (Iono 5  $\mu\text{M}$ ) em células TRPV1+ e TRPV1-. B. Gráfico quantitativo da variação da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por (-)-Cv 1 mM em células TRPV1+ e TRPV1- submetidas ao banho normal (KRH) ou pré-incubado por capsazepina (CPZ, 10  $\mu\text{M}$ ). Os valores foram obtidos pela equação:  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d * (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R) * (F_{\text{max}380} / F_{\text{min}380})$ . Valores expressos como a média  $\pm$  e.p.m. (n = 3x~15 células/campo). \*\*\*p < 0,001. ANOVA seguido de teste de Tukey.

#### **4.7.2 Avaliação da resposta de TRPV1 frente às sucessivas exposições por (-)-carvona**

Com a finalidade de investigar se o efeito antinociceptivo de (-)-carvona estaria associado à dessensibilização de canais TRPV1, realizou-se experimentos de imageamento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos, onde a (-)-carvona era sucessivamente incubada e removida das placas contendo células HEK 293 expressando canais TRPV1. De acordo com o Gráfico 19-A, pode-se observar que o efeito de (-)-carvona (1 mM) sobre os canais TRPV1 em uma primeira incubação, era totalmente cessado quando essas células eram submetidas a sucessivas exposições (5 min cada) por este monoterpene. Foi demonstrado, portanto, que o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $97,8 \pm 6,4$  nM (basal) para  $725,1 \pm 66,2$  nM ( $p < 0,05$ ) por (-)-carvona 1 mM, foi reduzido para  $112,8 \pm 7,5$  e  $106,6 \pm 8,5$  nM ( $p < 0,05$ ), após a segunda e terceira exposições, respectivamente (Gráfico 19-B).



**Gráfico 19 – Avaliação da dessensibilização dos canais TRPV1 por (-)-carvona.** A. Gráfico representativo da variação da taxa de fluorescência (F340/F380) frente ao efeito de (-)-carvona ((-)-Cv, 1 mM) seguido de sucessivas lavagens pela solução de banho (KRH) em células TRPV1+. B. Gráfico quantitativo da variação da concentração do Ca<sup>2+</sup> intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induzido por (-)-Cv (1 mM) em sucessivas exposições. Os valores foram obtidos pela equação:  $[Ca^{2+}]_i = Kd * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{max380} / F_{min380})$ . Valores expressos como a média ± e.p.m. (n = 2; duplicata; ~15 células/campo). \*\*\*p < 0,001. ANOVA seguido de teste de Tukey.

# Discussão

---

## 5 DISCUSSÃO

O alívio da sensação dolorosa continua sendo um dos grandes alvos da medicina moderna, onde se tenta, sobretudo, desenvolver substâncias que possuam efeito sobre o sistema nervoso central, podendo ser utilizadas no alívio das dores crônicas, ou ainda na obtenção de fármacos com eficácia semelhante ou maior do que aqueles já utilizados na terapêutica, mas com menor incidência de efeitos colaterais (McDOUGALL, 2011).

Sabendo-se que os compostos derivados de produtos naturais constituem alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas, estudos recentes têm demonstrado que o monoterpene (-)-carvona constitui uma molécula promissora para o tratamento da dor, uma vez que esta substância foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva, sob diferentes metodologias comportamentais para analgesia (GONÇALVES, 2008; GONÇALVES et al., 2008).

Não obstante, os dados obtidos por este estudo contribuirão para a melhor compreensão do perfil terapêutico dos óleos essenciais obtidos de espécies vegetais, principalmente do gênero *Mentha*, os quais a (-)-carvona geralmente aparece como principal constituinte ativo (DeSOUSA; NÓBREGA; ALMEIDA, 2007; GONÇALVES et al., 2008).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância dos distintos grupamentos químicos presentes nas moléculas dos monoterpenos com as suas respectivas funções farmacológicas. Por exemplo, DeSousa e col. (2007a) observaram que a potência do efeito antinociceptivo de monoterpenos análogos a rotundifolona, como (+)-pulegona, o óxido de limoneno, ou (+) - e (-)-carvona, estava diretamente relacionada com algumas pequenas diferenças estruturais nessas moléculas.

Outro trabalho relacionado com o estudo estrutura-atividade demonstrou que vários monoterpenos como o carvacrol, timol, dihidrocarveol e carveol, ativavam canais TRPV3 de forma mais potente do que a cânfora, um agonista conhecido desses canais (VOGT-EISELE et al., 2007). Nesse estudo os autores sugerem a importância da presença da hidroxila, comparando-se com grupos carbonilas, localizadas no anel de suas respectivas moléculas, para a determinação dos efeitos dos monoterpenos.

Portanto, é razoável pensar que modificações químicas na estrutura de (-)-carvona poderiam igualmente afetar as suas propriedades neurofarmacológicas. Em contrapartida, tais resultados viriam a fornecer novas informações sobre o modo de ação dos monoterpenos. Neste aspecto, o presente estudo investigou a relação estrutura-função entre a (-)-carvona e os seus análogos estruturais.

Em um estudo anterior, nosso grupo demonstrou que o efeito antinociceptivo de (-)-carvona, observado por meio de diferentes modelos *in vivo* para analgesia, estava associado com a diminuição da excitabilidade nervosa periférica, sendo esse efeito dependente de sua concentração (GONÇALVES, 2008; GONÇALVES et al., 2008). Para avaliar se a estereoisomeria de carvona estaria relacionada com esses efeitos, (+)-carvona foi investigada, sob essas mesmas condições experimentais, e em seguida comparou-se os seus efeitos aos previamente descritos para a (-)-carvona. Foi observado que (+)-carvona foi capaz de reduzir a condução dos nervos periféricos, de maneira concentração-dependente, apresentando uma  $CI_{50}$  de  $8,7 \pm 0,1$  mM (Hill= 2,3) (Gráfico 1), sendo relativamente mais potente que o seu estereoisômero (-)-carvona, cuja  $CI_{50}$  foi de  $10,7 \pm 0,1$  mM (Hill= 2.2), conforme demonstrado anteriormente por Gonçalves (2008). Apesar dessa diferença observou-se que os isômeros de carvona apresentaram semelhantes coeficientes de Hill, sugerindo-se que ambos os compostos parecem interagir com o mesmo sítio receptor, entretanto com diferentes afinidades. Experimentos adicionais também são necessários para confirmar essa observação.

Analisando-se as propriedades do PAC (potencial de ação composto) detalhadamente, pôde-se evidenciar outras semelhanças associadas à farmacologia da (+) - e (-)-carvona. Por exemplo, nosso estudo demonstrou que o efeito bloqueador foi parcialmente extinto devido à extensa lavagem desses compostos por solução fisiológica (Gráfico 2), sugerindo-se que ambos os monoterpenos atuam de modo reversível sobre o nervo periférico de rato. Além disso, ambos os isômeros da carvona novamente apresentaram semelhanças nos seus modos de ação ao analisarem-se os eventos de despolarização e repolarização do PAC. Na tabela 1 podemos observar que (+) - e (-)-carvona reduziram  $VD_{PAC}$  (velocidade de despolarização do PAC) em torno cerca de 50% a partir do controle, o que foi igualmente revertido após lavagem. Ao analisar-se a fase de repolarização do PAC, constatamos que (+)-carvona não promoveu qualquer alteração no  $\tau_{rep}$  (constante de

tempo de repolarização), assim como observado previamente com a (-)-carvona (GONÇALVES, 2008).

A fase de despolarização do PAC está relacionada à ativação de canais para sódio voltagem-dependentes (Hille, 2001). Conforme descrito anteriormente, um bloqueador padrão deste tipo de canal poderia reduzir taxa de condutância ao  $\text{Na}^+$  diminuindo assim, a ativação das fibras do feixe nervoso (Alves et al., 2010). Por outro lado, a repolarização PAC está associada com a inativação dos canais para sódio ( $\text{Na}_v$ ), bem como, com a ativação dos canais para potássio de retificação tardia, por isso é esperado que bloqueadores para esses canais reduzam os valores de  $\tau_{\text{rep}}$  (DESOUZA et al., 2006a; LONG et al., 2007). Portanto, podemos sugerir que ambos enantiômeros de carvona podem diminuir a excitabilidade nervosa por meio do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$  de maneira reversível, no entanto a inativação desses canais além da ativação dos canais para potássio não estariam diretamente relacionada com a ação de tais compostos sobre o nervo periférico.

Com a finalidade de identificar a importância de grupamentos estruturais sobre as características necessárias para o bloqueio da excitabilidade nervosa pela (-)-carvona, foram utilizados uma série de monoterpenos, semelhantes à carvona, entretanto com diferentes elementos estruturais associados a sua estrutura principal. Para tanto, os monoterpenos de escolha foram o (-)-carveol, o carvacrol e o (+)-limoneno (Figura 21).

Durante este estudo, os monoterpenos examinados que possuíam grupos hidroxila foram mais potentes do que os enantiômeros de carvona. Observamos que a redução da carbonila para um grupo hidroxila na posição 2 do anel de carvona, levou a um aumento do bloqueio do PAC (Gráfico 3). Além do mais, esses resultados estão de acordo com estudos anteriores demonstrando a importância da hidroxila como um requisito estrutural para atuar em canais iônicos (MOHAMMADI et al., 2001; VOGT-EISELE et al., 2007). Outro fator importante observado foi que o anel aromático, presente na molécula de carvacrol, inibiu a reversibilidade do efeito após lavagem, sugerindo que tal componente aumenta fortemente a afinidade de ligação ao receptor (Gráfico 3). No entanto, a ausência de oxigênio na molécula de (+)-limoneno, praticamente aboliu todos os efeitos descritos acima (Gráfico 3).

Além disso, nós avaliamos se as atividades dos compostos testados estariam relacionadas à suas respectivas solubilidades. Para isso, calculou-se o tempo

necessário para que todos os monoterpenos atingissem seus efeitos máximos e, em seguida, esses dados foram ajustados à equação de decaimento monoexponencial. Apesar de apresentarem solubilidades iguais, a (-)-carvona atingiu o seu efeito máximo mais lentamente do que (+)-carvona (Gráfico 4). Isto poderia ser explicado pelo fato de que essas moléculas possuem diferentes afinidades de ligação em seus receptores, conforme sugerido acima. Outro fator importante desse estudo foi que a taxa de decaimento necessária para cada monoterpeno alcançar o seu efeito máximo, não foi um reflexo de suas diferenças de potência. Nossos resultados mostraram que, apesar de (+)- e (-)-carvona compartilharem efeitos semelhantes nos eventos de despolarização e repolarização do PAC, esses estereoisômeros apresentaram diferentes taxas de decaimento (Gráfico 4). Já o carvacrol, o mais potente monoterpeno testado durante este estudo, atingiu o seu patamar mais lentamente do que (+)-carvona e (-)-carveol. Na verdade, o (-)-carveol foi o mais rápido composto a se difundir dentro das fibras nervosas e atingir o seu sítio receptor, provavelmente como resultado de um coeficiente de partição ideal quando comparado com os outros monoterpenos avaliados.

Para iniciar o estudo do efeito de (-)-carvona em nível celular, faz-se necessário determinar uma faixa de concentração em que este monoterpeno não esteja provocando danos às células em estudo. Neste sentido, testes de citotoxicidade celular são considerados como uma das ferramentas mais comumente utilizadas para a triagem eficiente na descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Os pontos finais para ensaios testes incluem membrana celular, membrana lisossômica e integridade mitocondrial. Interrupções de qualquer uma destas estruturas são indicativos de citotoxicidade e podem fornecer informações sobre a susceptibilidade de organelas celulares e compartimentos celulares (KIM et al, 2009; MELO et al, 2004).

O ensaio do vermelho neutro, por exemplo, é considerado um dos testes de citotoxicidade mais utilizados por ser um bom indicador da integridade da membrana celular. Este teste baseia-se na capacidade das células incorporarem o vermelho neutro, um corante supravital, que se acumula no interior dos lisossomos de células viáveis (REPETTO, DEL PESO, ZURITA, 2008). A quantidade de vermelho neutro detectado por colorimetria é, portanto, correlacionada com a função das células (SCHROTEROVA et al, 2009; VIEIRA et al, 2010).

De acordo com os resultados obtidos, demonstrou-se que (-)-carvona apresentou um baixo efeito citotóxico em neurônios DRG (Gráfico 5). Esses dados puderam garantir que concentrações menores que 4 mM desse monoterpene não seriam capazes de induzir danos à integridade de membrana das células em estudo, sendo possível a partir de então, determinar uma concentração não-tóxica.

Com o advento da técnica de citometria de fluxo, tem sido possível realizar testes de citotoxicidade de maneira rápida e eficiente, uma vez que esta técnica permite a avaliação de grandes populações celulares com grande reprodutibilidade (DARZYNKIEWICZ; HUANG, 2004). Utilizando-se o iodeto de propídio como marcador da integridade de membrana, é possível quantificar precisamente, a população de células que incorporaram este corante, que se liga ao DNA das células danificadas, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser do aparato de citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ; HUANG, 2004; KRISHAN, 1975).

A partir dos resultados obtidos por este método, pôde-se demonstrar que (-)-carvona também possui baixa toxicidade em células HEK 293 (Gráfico 6), apresentando uma  $CE_{50}$  de aproximadamente 5 mM. Esses dados corroboram o estudo anterior de citotoxicidade em neurônios DRG pelo teste do vermelho neutro, sugerindo o uso de concentrações de (-)-carvona inferiores à 4 mM em experimentos em nível celular. A partir deste estudo foi possível investigar o efeito de (-)-carvona sobre os canais iônicos de membrana bem como na determinação dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares, com a segurança de que as concentrações utilizadas não estivessem, relacionadas com alterações na integridade da membrana plasmática ou mesmo decorrentes da ativação de eventos de morte celular.

Os canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem ( $Na_v$ ) são considerados como as bases da excitabilidade neuronal, e muitos estudos recentes têm creditado esses canais como alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas para o tratamento de dores complexas, como por exemplo a dor neuropática (ARAÚJO et al., 2011; VELLANI et al., 2011; WAXMAN et al., 2000). A dor neuropática está associada a alterações na expressão gênica dos canais  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  e  $Na_v1.9$ , principalmente, após uma lesão no nervo, provocando uma hiperexcitabilidade nervosa (BLACK et al., 2004; DEVOR, 2006; DIB-HAJJ et al., 2007; POYRAZ et al., 2003). Esses canais são comumente expressos em neurônios

responsáveis pela transmissão da nocicepção periférica, como os neurônios DRG de pequeno diâmetro (VELLANI et al., 2011; WOOD et al., 2002).

De acordo com estudos prévios, que sugeriam que o efeito de (-)-carvona como bloqueador da excitabilidade periférica fosse resultante do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$  (GONÇALVES et al., 2008; 2010), realizou-se experimentos por meio da técnica de *Patch-clamp*, que permitiu avaliar o efeito deste monoterpreno diretamente sobre esses canais, em neurônios DRG de pequeno diâmetro. Após caracterizar as correntes totais de  $\text{Na}^+$  nesses neurônios (Figura 25; Gráfico 7), o presente estudo demonstrou que (-)-carvona (1 mM) foi capaz de reduzir significativamente as correntes de  $\text{Na}^+$  (Figura 26), comprovando-se pela primeira vez, a participação dos canais  $\text{Na}_v$  durante o efeito antinociceptivo deste monoterpreno. De acordo com o perfil das correntes obtidas após a perfusão com (-)-carvona, em comparação com as correntes controle, observou-se que a fase de inativação dos canais  $\text{Na}_v$  não estaria sofrendo alteração aparente (Figura 26), sugerindo-se um efeito bloqueador do poro do canal pelo monoterpreno. No entanto, esta hipótese assim como a identificação dos subtipos dos canais  $\text{Na}_v$  envolvidos, mais especificamente, não puderam ser verificados durante o presente estudo.

A confirmação do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$  por (-)-carvona poderia, portanto, explicar que a redução da excitabilidade periférica está relacionada com o seu efeito analgésico agudo, o qual foi evidenciado em estudos comportamentais específicos (GONÇALVES, 2008; GONÇALVES et al., 2008). Entretanto, outras vias de nocicepção da dor crônica ou a longo prazo, deflagradas principalmente pelo aumento da sensibilidade à dor causado pelas prostaglandinas e outros mediadores químicos (NICKEL et al., 2011), devem ser levadas em consideração.

Sabendo-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  é um íon essencial e está envolvido direta ou indiretamente nas vias de nocicepção, a monitoração dos seus níveis intracelulares constitui uma escolha adequada para a avaliação inicial da atividade farmacológica de algumas substâncias (ANAND; OTTO, 2010; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005). De tal modo, os efeitos de (-)-carvona em neurônios DRG foram investigados por meio de marcação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nessas células por fluorescência.

Durante esses experimentos, observou-se que 1 mM de (-)-carvona era capaz de induzir um rápido aumento do  $\text{Ca}^{2+}$ , a partir dos seus níveis basais, em neurônios DRG de pequeno diâmetro (Gráfico 8). Adicionalmente, o veículo utilizado

para a dissolução deste monoterpeno mostrou-se inerte durante esses testes, comprovando que os efeitos observados pertenciam de fato a (-)-carvona.

O aumento dos níveis citossólicos do  $\text{Ca}^{2+}$  nas células eucarióticas podem ser provenientes do meio externo, via canais iônicos ou trocadores iônicos, como exemplos, ou internamente, a partir da sua liberação dos estoques intracelulares. Para avaliar quais dessas vias estavam relacionadas com o efeito de (-)-carvona nos neurônios DRG, essas células foram submetidas a um banho zero- $\text{Ca}^{2+}$ . Dessa forma, foi possível demonstrar que este monoterpeno não mais induzia um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  nessas condições (Gráfico 9). Portanto, o efeito de (-)-carvona era dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  externo. A utilização de uma solução de cafeína e tapsigargina, como controles positivos, utilizados para liberar o  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático (HAWORTH et al., 1998; SASAKI; DAYANITHI; SHIBUYA, 2005), validou esse experimento (Gráfico 9).

Durante a transmissão dos sinais nociceptivos pelos neurônios DRG, vários tipos distintos de canais iônicos estão envolvidos. Dentre os canais iônicos dependentes de voltagem mais relatados estão os canais  $\text{Ca}_v$  do tipo L ( $\text{Ca}_v1.1-1.4$ ), P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ) e N ( $\text{Ca}_v2.2$ ), os canais para sódio ( $\text{Na}_v$ ) dos subtipos 1.3, 1.7, 1.8 e 1.9, e os canais para potássio ( $\text{K}_v$ ). Alguns estudos têm atribuído considerável importância na modulação da dor aos canais NMDA-glutamatérgicos (CHIZH et al., 2001), muscarínicos  $\text{M}_1$  e  $\text{M}_2$  (NAGUIB; YAKSH, 1997) e os receptores transientes de potencial (TRP's) como o TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1, bem como aos canais P2X de receptores purinérgicos do subtipo X (LEE; LEE; OH, 2005).

Para investigar se alguns destes canais estariam envolvidos durante os efeitos de (-)-carvona, realizou-se um ensaio inicial, um *screening* farmacológico, utilizando-se alguns bloqueadores como o  $\text{CdCl}_2$ , para canais  $\text{Ca}_v$ , MK-801, para NDMA, atropina para muscarínicos e vermelho de rutênio para TRPs. Dentre estes antagonistas, apenas o vermelho de rutênio foi capaz de bloquear a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela (-)-carvona em neurônios DRG (Gráfico 10). Entretanto, ainda seria necessário descobrir qual tipo de canal TRP estaria sendo ativado por este monoterpeno.

Dentre os canais TRP, os pertencentes à subfamília dos receptores vanilóides, TRPVs, são focos de maiores interesses como alvos potenciais para

novas drogas analgésicas (GRAAF; HOENDEROP; BINDELS, 2006). Dentre estes, o canal TRPV1 é o mais estudado e vários trabalhos têm demonstrado a sua importância com a sensibilidade à dor. Conseqüentemente, os moduladores de TRPV1 estão sendo investigados como potenciais candidatos analgésicos para vários tipos de complicações da dor (McDOUGALL, 2011).

Ao utilizar-se a capsazepina, um antagonista seletivo dos canais TRPV1 durante a incubação de neurônios DRG com (-)-carvona (1 mM), foi possível demonstrar que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  fora totalmente bloqueado (Gráfico 12), sugerindo-se, pela primeira vez, a participação desses canais no mecanismo de ação de (-)-carvona. Adicionalmente, verificou-se que (-)-carvona aumentou cerca de 3 vezes, as concentrações citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos níveis basais (controle), efeito esse totalmente inibido em situações de zero- $\text{Ca}^{2+}$  no banho externo ou pelo vermelho de rutênio ou capsazepina (Gráfico 13). No entanto, devido ao grande número de receptores TRPs serem expressos nesses neurônios, experimentos adicionais foram realizados para confirmar a ação de (-)-carvona diretamente sobre os canais TRPV1, ou ainda, se outros tipos de canais TRPs também estariam participando nesse efeito.

O canal TRPM2 é permeável aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e é formado por dois distintos domínios protéicos, onde um funciona como um canal iônico enquanto o outro possui função enzimática, atuando como uma pirofosfatase, ligando-se especificamente ao ADP-ribose (ADPR) (PERRAUD et al. 2001). Esse canal também é sensível às espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo ser ativado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e por isso estando envolvido em processos de morte celular em resposta ao estresse oxidativo (XIE; MACDONALD; JACKSON, 2010).

Em um estudo recente, Naziroglu e col. (2011) sugerem que a ativação dos canais TRPM2 em neurônios DRG esteja relacionada com a indução de processos inflamatórios como consequência do estresse oxidativo, dessa forma contribuindo para a etiologia da dor neuropática. Com base nesse relato, investigou-se a possibilidade dos efeitos de (-)-carvona estarem relacionados com as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  geradas via TRPM2. No entanto, nenhum efeito foi observado sobre esses canais (Gráfico 15), descartando esta hipótese.

Com o advento da biologia molecular, tornou-se possível desenvolver sistemas celulares heterólogos em laboratório, por meio da expressão de

determinados receptores protéicos em células que não os possuam normalmente, ou mesmo que os apresentem em baixas quantidades. Essas técnicas são de grande relevância científica, uma vez que possibilitam determinar a participação direta desses receptores frente aos fármacos em teste. Dessa forma, realizou-se a expressão heteróloga do canal TRPV1 em células HEK 293

Por meio de técnicas amplamente utilizadas em biologia molecular, o cDNA que codifica o canal TRPV1, gentilmente cedido pelo Dr. David Julius (Anexo), foi transformado e amplificado em bactéria eletrocompetente (DH5 $\alpha$ ), e logo em seguida purificado e identificado como sendo o canal TRPV1 de *Rattus norvegicus* (Figuras 28 e 29). A partir desta confirmação, esse cDNA foi transientemente transfectado em células HEK 293, por meio da técnica de co-precipitação pelo fosfato de cálcio.

A partir de experimentos utilizando a capsaicina e a capsazepina como ferramentas controle, para induzir a ativação e o antagonismo de canais TRPV1, respectivamente, pôde-se confirmar o sucesso da expressão heteróloga de acordo com a metodologia utilizada neste estudo (Gráfico 16). Por meio de co-transfecção dessas células com o marcador fluorescente mCherry, as células transfectadas com o cDNA-TRPV1 puderam ser selecionadas durante os experimentos por imagem pelo cálcio. A partir de então, o efeito de (-)-carvona sobre os canais TRPV1 heterologamente expressos em células HEK 293, puderam ser investigados.

De acordo com os resultados obtidos, demonstrou-se que (-)-carvona atua sobre esses canais, aumentando os níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelulares apenas nas células TRPV1 positivas (TRPV1+), ao passo que as células controle negativo (TRPV1-), mantiveram-se inertes à presença do monoterpeno (Figura 30). Adicionalmente, verificou-se que tal efeito era dependente de concentração, apresentando uma CE<sub>50</sub> de 1,3 $\pm$ 0,2 mM (Hill= 2,5), indicando uma possível interação do tipo cooperativa desse monoterpeno com o canal (Gráfico 17).

Posteriormente, o efeito de (-)-carvona em TRPV1 pode ser confirmado por meio de antagonismo pela capsazepina (Gráfico 18). O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a (-)-carvona atua em canais do tipo TRPV1. No entanto o mecanismo antinociceptivo desse monoterpeno ainda não pôde ser sugerido a partir desses dados isolados.

Estudos recentes sugerem que a ativação dos canais TRPV1, seguindo de rápida dessensibilização, constitui uma explicação plausível para o efeito analgésico de monoterpenos ativadores desses canais, como por exemplo, a cânfora (XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005). Essa hipótese também pode explicar o efeito paradoxalmente analgésico provocado pela capsaicina, quando utilizada em uso tópico (SZOLCSÁNYI, 2006).

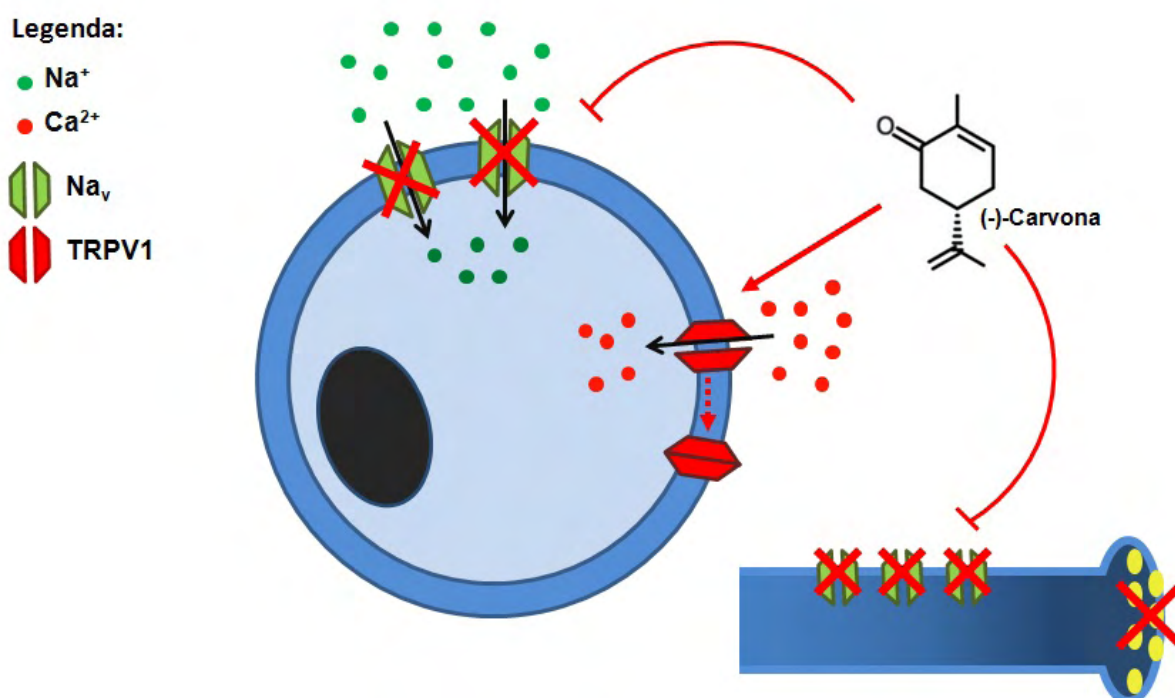
Com a finalidade de se investigar se o efeito antinociceptivo de (-)-carvona estaria associado à dessensibilização de canais TRPV1, realizou-se experimentos de microscopia de fluorescência pelo cálcio, onde a (-)-carvona era repetidamente exposta às células HEK 293 transfectadas com TRPV1. Desse modo, a ativação de TRPV1 pela (-)-carvona foi totalmente cessada quando as células eram submetidas à sucessivas exposições a esse monoterpeno (Gráfico 19). Sugerindo-se que, apesar de ativar os canais TRPV1 em um primeiro momento, o uso contínuo de (-)-carvona promove a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  nessas células via TRPV1, provavelmente devido a dessensibilização desse receptor.

Estudos recentes demonstraram que alguns sítios de fosforilação do canal TRPV1, como S116, T370, S502, T704 e S800, estão relacionados com a sua dessensibilização (NUMAZAKI et al., 2002; PREMKUMAR; AHERN, 2000; SZOLCSÁNYI, 2006; SZALLASI et al., 2007). Pode-se sugerir, portanto, que esses sítios estariam envolvidos no mecanismo molecular da (-)-carvona sobre o canal TRPV1, provavelmente impedindo a sua fosforilação pelos moduladores positivos PKA e PKC, envolvendo  $PIP_2$  e  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Entretanto, esta hipótese somente poderia ser confirmada através de estudos adicionais.

Apesar da identidade dos canais iônicos responsáveis pela ativação de potenciais de ação propagados a partir de nervos sensíveis a capsaicina não serem totalmente elucidadas, um estudo recente demonstrou que os canais  $Na_v$  resistentes à tetrodotoxina (TTX-R) estão envolvidos no reflexo axonal de nervos intestinais, após ativação de canais TRPV1 (MIRANDA-MORALES et al., 2010). Sabendo-se que (-)-carvona promove um efeito bloqueador das correntes geradas por canais  $Na_v$  em neurônios DRG, é possível que a dessensibilização de canais TRPV1 por este monoterpeno implique, de algum modo, na modulação de canais TTX-R ( $Na_{v1.8}$ ,  $Na_{v1.9}$ ), contribuindo assim, para um efeito analgésico mais eficaz e a longo prazo. Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar essa hipótese.

Em suma, o presente estudo evidenciou que a substituição do grupamento carbonila por uma hidroxila na molécula de (-)-carvona poderia aumentar a eficiência desse monoterpeno na redução da excitabilidade nervosa periférica. Efeito este que foi demonstrado como sendo resultante do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$ , bem como pela ativação e posterior dessensibilização de canais TRPV1, indicando a grande potencialidade deste monoterpeno como uma molécula antinociceptiva periférica ou protótipo de nova droga analgésica.

### 5.1 Mapa conceitual



**Figura 31 – Mecanismo de ação antinociceptivo de (-)-carvona sobre o SNP.** A figura demonstra o efeito de (-)-carvona sobre o soma do neurônio DRG (centro), bloqueando canais  $\text{Na}_v$  e promovendo a ativação e posterior dessensibilização de canais TRPV1. Abaixo à direita está representado o bloqueio da excitabilidade nervosa periférica, resultante do bloqueio de canais  $\text{Na}_v$  por (-)-carvona.

# Conclusões

---

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o monoterpeno (-)-carvona:

- ✓ Apresentou o efeito bloqueador da excitabilidade nervosa dependente do grupamento carbonila presente na sua molécula, cuja deleção ou substituição, respectivamente, diminuiu ou aumentou tal efeito;
- ✓ Apresenta baixa citotoxicidade em neurônios DRG e em células HEK 293;
- ✓ Reduziu as correntes totais de  $\text{Na}^+$  geradas por dos canais  $\text{Na}_v$  de neurônios DRG;
- ✓ Aumentou os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares em neurônios DRG, de modo dependente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular;
- ✓ Teve seus efeitos sobre neurônios DRG totalmente bloqueados pelos antagonistas vermelho de rutênio e capsazepina;
- ✓ Não promoveu qualquer efeito sobre canais TRPM2 estavelmente expressos em células T-REx/TRPM2;
- ✓ Aumentou os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares em células HEK 293 expressando heterologamente canais TRPV1, de modo dependente de concentração;
- ✓ Teve seus efeitos sobre células HEK 293, que expressavam heterologamente os canais TRPV1, totalmente bloqueados pelo antagonista capsazepina;
- ✓ Atua sobre os canais TRPV1 promovendo a sua ativação e posterior dessensibilização.

# Perspectivas

---

## 7 PERSPECTIVAS

Em face da potencialidade de (-)-carvona como um novo agente analgésico ou protótipo de nova droga analgésica conforme demonstrado neste trabalho, sugere-se, portanto, a continuação do estudo acerca dos mecanismos antinociceptivos deste monoterpeneo, dando maior enfoque aos subtipos específicos de canais  $Na_v$  envolvidos neste efeito, bem como nas vias moleculares de dessensibilização do canal TRPV1.

# Referências

---

## REFERÊNCIAS

AGNEW, W.S.; MOORE, A.C.; LEVINSON, S.R.; RAFTERY, M.A. Identification of large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding proteins from the electroplax of *Electrophorus electricus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 92, p. 860–866, 1980.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334–338, 1996.

ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; FATURI, C. B.; CATALANI, B.; LEITE, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 77, p. 361–364, 2004.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; AGRA, M. F.; ALMEIDA, E. R.; MAJETICH, G.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic Effect of Dioclenol and Dioflorin Isolated from *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 394–395, 2000.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v. 8, p. 310–322, 2001.

ALMEIDA, R.N.; AGRA, M.F; MAIOR, F.N.S; DE SOUSA, D.P. Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. **Molecules**, v. 23, 0p. 2726-42, 2011.

ALVES, A.M.H.; GONÇALVES, J.C.R.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M. Evaluation of the sesquiterpene (-)- $\alpha$ -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neuroscience Letters**, v. 472, p. 11–15, 2010.

ANAND, U.; OTTO, W.R.; ANAND, P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-11, 2010.

ARAÚJO, D.A.M.; FREITAS, C.; CRUZ, J.S. Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology. **Life Sciences**, v. 89, p. 540-544, 2011.

ARENDRT-NEILSEN, L; SVENSSON, P. Referred muscle pain: Basic and clinical findings. **The Clinical Journal of Pain**, v. 17, p. 11–19, 2001.

ARMSTRONG, C.M.; HILLE, B. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. **Neuron**, v. 20, p.371, 1998.

BALLANTYNE, J. C. Opioid misuse in oncology pain patients. **Current Pain and Headache Reports**, v. 11, p. 276–282, 2007.

BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; GLAZER, J.M.; TSURUDA, P.R.; BASBAUM, A.I.; STUCKY, C.L.; JORDT, S.E.; JULIUS, D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v. 448, p. 204–208, 2007.

BLACK, J. A.; LIU, S.; TANAKA, M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia in inflammatory pain. **Pain**, v. 108, p. 237–247, 2004.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (Htd/NR 90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, p. 7-9, 1984.

BRAUCHI, S.; ORTA, G.; SALAZAR, M.; ROSENMAN, E.; LATORRE, R. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 4835–4840, 2006.

BREER, H. Molecular reaction cascades in olfactory signal transduction. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 621–625, 1991.

BUCHBAUER, G.; JÄGER, W.; GRUBER, A.; DIETRICH, H. R-(+)- and S-(–)-Carvone: influence of chirality on locomotion activity in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 686–689, 2005.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; FILHO, V.C. YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substance from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRE, E., FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 179– 208, 2005.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**, v. 73, p. 116–120, 2002.

CASPARY T.; ANDERSON K.V. Patterning cell types in the dorsal spinal Cord: what the mouse mutants say? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 289-297, 2003.

CATERINA, M.J.; ROSEN, T.A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A.J.; JULIUS, D.A. capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature** v. 398, p. 436–441, 1999.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-24, 1997.

CATTERALL, W.; CASTÈLE, S.; YAROV-YAROVY, V.; YU, F.H.; KONOKI, K.; SHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 124–141, 2007.

CHIZH, B.A.; REISSMULLER, E.; SCHLUTZ, H.; SCHEEDE, M.; HAASE, G.; ENGLBERGER, W. Supraspinal vs. spinal sites of the antinociceptive action of the subtype-selective NMDA antagonist ifenprodil. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 212–220, 2001.

CODERRE, T.J.; VAN EMPLÉ, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**, v. 59, p. 345–352, 1994.

CRUZ, J.S.; MATAVEL, A.C.S.; LEÃO-FILHO, H.M.; MORAES-SANTOS, T.; BEIRÃO, P.S.L. Tityustoxin effect on nerve compound action potentials requires extracellular sodium. **Neuroscience Letters**, v. 282, p. 25–28, 2000.

CUMMINS, T.R.; RUSH, A.M.; ESTACION, M.; DIB-HAJJ, S.D.; WAXMAN, S.G. Voltage-clamp and current-clamp recordings from mammalian DRG neurons. **Nature Protocols**, v. 4, p. 1103-1112, 2009.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HUANG, X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. **Current Protocols in Immunology**, Review, capítulo 5, unidade 5.7, 2004.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231–235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; JÚNIOR, E.V.M.; OLIVEIRA, F.S.; ALMEIDA, R.N.; NUNES, X.P.; BARBOSA-FILHO, J.M. Antinociceptive Activity of Structural Analogues of Rotundifolone: Structure-Activity Relationship. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 39–42, 2007a.

DE SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F., CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha,\beta$ -epoxy-carvone in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 170–175, 2007b.

DE SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. **Chirality**, v. 19, p.264–268, 2007.

DE SOUSA, D.P.; OLIVEIRA, F.S.; ALMEIDA, R.N. Evaluation of the central activity of hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 811–812, 2006.

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **The Journal of Pain**, v. 7, p. S3-S12, 2006.

DIB-HAJJ, S.D.; CUMMINS, T.R; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. From genes to pain: Nav 1.7 and human pain disorders. **Trends in neuroscience**, v. 30, p. 555–563, 2007.

DORRIES, K.M.; KAUER, J. S. Relationships between odor-elicited oscillations in the salamander olfactory epithelium and olfactory bulb. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, p. 754–765, 2000.

DWORKIN, R.H. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. **The Clinical Journal of Pain**, v. 18, p. 343–349, 2002.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.P.C.; SANTOS, M.A.C.; SIQUEIRA, I.R.; AMADOR, T.A. Sedative properties of linalool. **Fitoterapia**, v. 66, p. 407–414, 1995.

FREDERICK, J.; BUCK, M.E.; MATSON, D.J.; CORTRIGHT, D.N. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 1058–1064, 2007.

GALEOTTI, N.; MANNELLI, L. D.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145–148, 2002.

GOLDIN, A.L.; BARCHI, R.L.; CALDWELL, J.H.; HOFMANN, F.; HOWE, J.R.; HUNTER, J.C.; KALLEN, R.G.; MANDEL, G.; MEISLER, M.H.; BERWALD NETTER, Y.; NODA, M.; TAMKUN, M.M.; WAXMAN, S.G.; WOOD, J.N.; CATTERALL, W.A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 28, p. 365–368, 2000.

GONÇALVES, J.C.R. **Estudo do Efeito Antinociceptivo de (–)-Carvona em Modelos Experimentais *in vivo* e *in vitro***. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A.M.H.; ARAÚJO, A.E.V.; CRUZ, J.S.C.; ARAÚJO, D.A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 108-112, 2010.

GRAHAM, F.L.; VAN DER EB, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52, p. 456–67, 1973.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 3440-50, 1985.

GÜLER, A.D.; LEE, H.; IIDA, T.; SHIMIZU, I.; TOMINAGA, M.; CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 6408–6414, 2002.

HALL, A.C.; TURCOTTE, C. M.; BETTS, B. A.; YEUNG, W. Y.; AGYEMAN, A. S.; BURK, L. A. Modulation of human GABA<sub>A</sub> and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, p. 9–16, 2004.

HAMILL, O.P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 391, p. 85-100, 1981.

HARRIS, R. C.; BREYER, M. D. Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, p. 236–45, 2006.

HAWORTH, R.A.; GOKNUR, A.B.; BIGGS, A.V.; REDON, D.; POTTER, K.T. Ca uptake by heart cells: I. Ca uptake by the sarcoplasmic reticulum of intact heart cells in suspension. **Cell Calcium**, v. 23, p. 181-98, 1998.

HEUBERGER, E.; HONGRATANAWORAKIT, T.; BOHM, C.; WEBER, R.; BUCHBAUER, G. Effects of chiral fragrances on human autonomic nervous system parameters and self-evaluation. **Chemical Senses**, v. 26, p. 281–92, 2001.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**, 3<sup>th</sup> edition. Sunderland, Massachusetts - USA: Sinauer, 2001, 814p.

HUANG, F.C; KUTCHAN, T.M. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 555–564, 2000.

HUANG, H.Y.; CHENG, J.K.; SHIH, Y.H.; CHEN, P.H.; WANG, C.L.; TSAUR, M.L. Expression of A-type K channel alpha subunits Kv 4.2 and Kv 4.3 in rat spinal lamina II excitatory interneurons and colocalization with pain-modulating molecules. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p.1149-57, 2005.

HUANG, Z.J; SONG, X.J. Differing alterations of sodium currents in small dorsal root ganglion neurons after ganglion compression and peripheral nerve injury. **Molecular Pain**, v. 4, p. 1-15, 2008.

IWAMOTO, E.T.; MARION, L. Characterization of the antinociception produced by intrathecally administered muscarinic agonists in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, p. 329–338, 1993.

JANN, M.W.; SLADE, J.H. Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. **Pharmacotherapy**, v. 27, p. 1571–1587, 2007.

JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 7325–7333, 1999.

JOHANNESSEN LANDMARK, C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. **CNS Drugs**, v. 22, p. 27–47, 2008.

JOHNSON, D.M.; GARRETT, E.M.; RUTTER, R.; BONNERT, T.P.; GAO, Y.D.; MIDDLETON, R.E.; SUTTON, K.G. Functional mapping of the transient receptor potential vanilloid 1 intracellular binding site. **Molecular Pharmacology**, v. 70, p. 1005–1012, 2006.

JORDAN, M.; WURM, F.M. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. **Methods**, v. 33, p. 136–143, 2004.

JORDT, S.E.; JULIUS, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to ‘hot’ chili peppers. **Cell**, v. 108, p. 421–430, 2002.

KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp. Neurol.**, v. 200, p. 112–123, 2006.

KIM, H.; YOON, S.C.; LEE, T.Y.; JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, v. 184, p. 13-17, 2009.

KIRNER, A.; DEUTSCH, S.; WEILER, E.; POLAK, E.H.; APFELBACH, R. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 201–206, 2003.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **J. Cell Biol.**, v. 66, p. 188-193, 1975.

LEE, Y.; LEE, C-H.; OH, U. Painful Channels in Sensory Neurons. **Molecular Cells**, v. 20, p. 315-324, 2005.

LI, W.; GAO, S.B.; LV, C.X.; WU, Y.; GUO, Z.H.; DING, J.P.; XU, T. Characterization of voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 212, p. 348-57, 2007.

LIEDTKE, W. CHOE, Y. MARTI-RENOM, M.A. BELL, A.M. DENIS, C.S. SALI, A. HUDSPETH, A.J. FRIEDMAN, J.M. HELLER, S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. **Cell**, v. 103, p. 525–535, 2000.

LONG, S.B.; TAO, X.; CAMPBELL, E.B.; MACKINNON, R. Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. **Nature**, v. 450, p. 376–382, 2007.

MAIOR, F. N. S.; SIQUEIRA, J. S.; BARBOSA, M. D.; ALMEIDA, R. N. Desenvolvimento Pós-natal da Prole exposta ao Extrato Hidroalcoólico da *Cissampelos sympodialis* Eichl., durante o Período Gestacional de Ratas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, p. 321–5, 2003.

MARTIN, T.J.; EISENACH, J.C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, p. 811–817, 2001.

MARTINS, A.H.; ALVES, J.M.; TRUJILLO, C.A.; SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MOTTA, F.L.; GUIMARAES, A.O.; CASARINI, D.E.; MELLO, L.E.; PESQUERO, J.B.; ULRICH H. Kinin-B2 Receptor Expression and Activity During Differentiation of Embryonic Rat Neurospheres. **Cytometry A**, v. 73, p. 361-368, 2008.

MCDUGALL, J.J. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, p. 459–467, 2011.

MCKEMY, D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v. 416, p. 52–58, 2002.

MCMAHON, S.; BENNETT, D. Pain mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, 2007.

MELO, P.S.; DE AZEVEDO, M.B.M.; ZULLO, M.A.T.; FABRIN-NETO, J.B.; HAUN, M. Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. **Human & Experimental Toxicology**, p. 1-7. 2004.

MIRANDA-MORALES, M.; OCHOA-CORTES, F.; STERN, E.; LOMAX, A.E.; VANNER, S. Axon Reflexes Evoked by Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Activation Are Mediated by Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels in Intestinal Afferent Nerves. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, p. 566–575, 2010.

MOGIL, J.S.; DAVIS, K.D.; DERBYSHIRE, S.W. The necessity of animal models in pain research. **Pain**, v. 151, p. 12–17, 2010.

MOHAMMADI, B.; HAESLER, G.; LEUWER, M.; DENGLER, R.; KRAMPFL, K.; BUFLER, J. Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA(A) receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 85–91, 2001.

MOQRICH, A.; HWANG, S.W.; EARLEY, T.J.; PETRUS, J.; MURRAY, N.; SPENCER, H.S.R. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. **Science**, v. 307, p. 1468–1472, 2005.

MORA, S.; DIAZ-VELIZ, G.; MILLAN, R.; LUNGENSTRASS, H.; QUIROS, S.; COTO-MORALES, T.; HELLION-IBARROLA, M.C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 82, p. 373–378, 2005.

MORAES, D.S.C.; CAMARGO, E.A. Antidepressivos e anticonvulsivos utilizados no tratamento da dor neuropática. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 77, p. 44–47, 1999.

MUNIR, M.A.; ENANY, N.; ZHANG, J.M. Nonopioid analgesics. **Anesthesiology Clinics**, v. 25, p. 761–774, 2007.

MUTAI, H.; HELLER, S. Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors. **Cell Calcium**, v. 33, p. 471–478, 2003.

NAGUIB, M.; YAKSH, T.L. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate antinociception in the rat spinal cord. **Anesthesia and Analgesia**, v. 85, p. 847–853, 1997.

NAZIROGLU, M.; OZGUL, C.; CELIK, O.; CIG, B.; SOZBIR, E. Aminoethoxydiphenyl Borate and Flufenamic Acid Inhibit Ca<sup>2+</sup> Influx Through TRPM2 Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Activated by ADP-Ribose and Rotenone. **Journal of Membrane Biology**, v. 241, p. 69–75, 2011.

NICKEL, F.T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, in press, 2011.

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, T.; TOYOOKA, H.; TOMINAGA, M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C- $\epsilon$  and identification of two target serine residues. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 13375–13378, 2002.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 271–280, 2004.

PAN, H.L.; WU, Z.Z.; ZHOU, H.Y.; CHEN, S.R.; ZHANG, H.M. LI, D.P. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, p. 141–161, 2008.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50–52, 2005.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A.B.D.; CHORGHADDE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, p. 789–799, 2004.

PEANA, A.T.; MONTIS, M.G.; NIEDDU, E.; SPANO, M.T.; D'AQUILA, P.S.; PIPPIA, P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (–)-linalool. **European Journal Pharmacology**, v. 485, p. 165–174, 2004.

PEIER, A.M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A.C.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; Story, G.M.; Earley, T.J.; Dragoni, I.; McIntyre, P.; Bevan, S.; Patapoutian, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, **Cell**, v. 108, p. 705–715, 2002.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical review. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 71–80, 2007.

PERRAUD, A-L; TAKANISHI, C.L.; SHEN, B.; KANG, S.; SMITH, M.K.; SCHMITZ, C.; KNOWLES, H.M.; FERRARIS, D.; LI, W.; ZHANG, J.; STODDARD, B.L.; SCHARENBERG, A.M. Accumulation of Free ADP-ribose from Mitochondria Mediates Oxidative Stress-induced Gating of TRPM2 Cation Channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6138–6148, 2005.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237–243, 2001.

POYRAZ, D.; BRAU, M.E.; WOTKA, F.; PUHLMANN, B.; SCHOLZ, A.M.; HEMPELMANN, G.; KOX, W.J.; SPIES, C.D.. Lidocaine and Octanol Have Different Modes of Action at Tetrodotoxin-Resistant Na<sup>+</sup> Channels of Peripheral Nerves, **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, p. 1317-1324, 2003.

PREMKUMAR, L. S.; AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, v. 408, p. 985–990, 2000.

PROUDFOOT, C.J.; GARRY, E.M.; COTTRELL, D.F.; ROSIE, R.; ANDERSON, H.; ROBERTSON, D.C.; FLEETWOOD-WALKER, S.M.; MITCHELL, R. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. **Current Biology**, v. 16, p. 1591–1605, 2006.

REID, G. ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? **Pflügers Archives**, v. 451, p. 250–263, 2005.

RENTON, T. An update on pain. **British Dental Journal**, v. 22, p. 335–338, 2008.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1125 – 1131, 2008.

ROHL, C.A.; BOECKMAN, F.A.; BAKER, C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A.; KLEVIT, R.E. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. **Biochemistry**, v. 38, p. 855–861, 1999.

SAKATA, R.; GOZZANI, J.L. Fisiopatologia da dor. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 51, p. 3–11, 1994.

SANO, Y; INAMURA, K; MIYAKE, A; MOCHIZUKI, S.; YOKOI, H.; MATSUSHIME, H.; FURUICHI, K. Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx mediated by LTRPC2. **Science**, v. 293, p. 1327–1330, 2001.

SASAKI, N.; DAYANITHI, G.; SHIBUYA, I. Ca<sup>2+</sup> clearance mechanisms in neurohypophysial terminals of the rat. **Cell Calcium**, v. 37, p. 45-56, 2005.

SCHRÖTEROVÁ, L.; KRÁLOVÁ, V.; VORÁCOVÁ, A.; HAŠKOVÁ, P.; RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1406-11, 2009.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S; SAMPAIO, A.L.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 16, p. 38–43, 2000.

SKLARS, P. B.; ANHOLTS, R. R. H.; SNYDERLF, S. H. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 15538–15543, 1986.

SMITH, G.D. *et al.* TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. **Nature**, v. 418, p. 186–190, 2002.

STÄMPFLI, R. A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. **Experientia**, v. 10, p. 508–509, 1954.

STORY, G.M. PEIER, A.M. REEVE, A.J. EID, S.R. MOSBACHER, J. HRICIK, T.R. EARLEY, T.J. HERGARDEN, A.C. ANDERSSON, D.A. HWANG, S.W. MCINTYRE, P. JEGLA, T. BEVAN, S. PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112 p. 819–829, 2003.

SUN, Y.M.; FAVRE, I.; SCHILD, L.; MOCZYDLOWSKI, E. On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel—Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$ , and molecular sieving. **The Journal of General Physiology**, v. 110, p. 693–715, 1997.

SUZUKI, M.; MIZUNO, A.; KODAIRA, K.; IMAI, M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22664–22668, 2003.

SUZUKI, M.; WATANABE, Y.; OYAMA, Y.; MIZUNO, A.; KUSANO, E.; HIRAO, A.; OOKAWARA, S. Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. **Neuroscience Letters**, v. 353, p. 189–192, 2003.

SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A.; EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 357-372, 2007.

SZOLCSÁNYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology. **Neuropeptides**, v. 38, p. 377–384, 2006.

TALAVERA, K.; YASUMATSU, K.; VOETS, T.; DROOGMANS, G.; SHIGEMURA, N.; NINOMIYA, Y.; MARGOLSKEE, R.F.; NILIUS B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. **Nature**, v. 438, p. 1022–1025, 2005.

TOUSOVA, K.; VYKLICKY, L.; SUSANKOVA, K.; BENEDIKT, J.; VLACHOVA, V. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 30, p. 207–217, 2005.

TURK, D.C.; OKIFUJI, A. Pain terms and taxonomies of pain, Em: FISHMAN, S.M.; BALLANTYNE, J.C.; RATHMELL, J.P. (Eds.), **Bonica's Management of Pain**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, p. 14–23, 2009.

VAN DE GRAAF, S.F.; HOENDEROP, J.G.; BINDELS, R.J. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 290, p. F1295–F1302, 2006.

VELLANI, V.; FRANCHI, S.; PRANDINI, M.; MORETTI, S.; PAVESI, G.; GIACOMONI, C.; SACERDOTE P. Nimesulide inhibits protein kinase C epsilon and substance P in sensory neurons - comparison with paracetamol. **Journal of Pain Research**, v. 4, p. 177-87, 2011.

VIEIRA, M.D.; DE OLIVEIRA, V.; LIMA, E.M.; KATO, M.J.; VALADARES, M.C. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 505-10, 2010.

VOGT-EISELE, A.K.; KWEBER, S.; HERKHELI, M.A.; VIELHABER, G. PANTEN, J.; GISSELMANN, G.; HATT, H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. **British Journal of Pharmacology**, v. 51, p. 530–540, 2007.

VRIENS, J.; OWSIANIK, G.; FISSLTHALER, B.; SUZUKI, M.; JANSSENS, A.; VOETS, T.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B.D.; FLEMING, I.; BUSSE, R.; NILIUS, B. Modulation of the Ca<sup>2+</sup> permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. **Circulation Research**, v. 97, p. 908–915, 2005.

WATANABE, H.; VRIENS, J.; PRENEN, J.; DROOGMANS, G.; VOETS, T.; NILIUS, B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. **Nature**, v. 424, p. 434–438, 2003.

WAXMAN, S.G.; DIB-HAJJ, S.; CUMMINS, T.R.; BLACK J.A. Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states. **Brain Research**, v. 886, p. 5–14, 2000.

WIGLER, M.; SILVERSTEIN, S.; LEE, L.S.; PELLICER, A.; CHENG, Y.; AXEL, R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. **Cell**, v. 11, p. 223-32, 1977.

WILLIAMS, D.A.; FOGARTY, K.E.; TSIEN, R.Y.; FAY, F.S. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. **Nature**, v. 318, p. 558-61, 1985.

WOOD, J.N.; AKOPIAN, A.N.; BAKER, M.; DING, Y.; GEOGHEGAN, F.; NASSAR, M.; MALIK-HALL, M.; OKUSE, K.; POON, L.; RAVENALL, S.; SUKUMARAN, M.; SOUSLOVA, V. Sodium channels in primary sensory neurons: relationship to pain states. **Novartis Foundation Symposium**, v. 241, p. 159-68, 2002;

XIE, Y.F.; MACDONALD, J.F.; JACKSON, M.F. TRPM2, calcium and neurodegenerative diseases. **Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.**, v. 2, p. 95-103, 2010.

XING, H.; CHEN, M.; LING, J.; TAN, W.; GU, J.G. TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 13680–13690, 2007.

XU, H.; BLAIR, N.T.; CLAPHAM, D.E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8924-8937, 2005.

XU, X.Z.; MOEBIUS, F.; GILL, D.L.; MONTELL, C. Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 10692–10697, 2001.

YAMAZUMI, I.; OKUDA, T.; KOGA, Y. Involvement of potassium channels in spinal antinociceptions induced by fentanyl, clonidine and bethanechol in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 87, p. 268–276, 2001.

YOUNIS, Y.M.H.; BESHIR, S.M. Carvone-rich essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperii* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 539–541, 2004.

YU, F.H.; CATTERALL, W.A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science's STKE**, v. 253, review 15, p. 1–17, 2004.

ZAGRANICHNAYA, T. K.; WU, X.; VILLERREAL, M. L. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 29559–69, 2005.

# Anexos

---

## ANEXOS

### 1 TRABALHOS REALIZADOS COM DADOS DA TESE

#### 1.1 Artigo publicado em periódico

GONÇALVES, J.C.R.; ALVES, A.M.H.; ARAÚJO, A.E.V.; CRUZ, J.S.C.; ARAÚJO, D.A.M. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 108-112, 2010.

#### 1.2 Comunicação oral em congresso

GONCALVES, J.C.R.; SOUZA, H.D.N.; NERY, A.A.; ULRICH, A.H.; PRADO, V.F.; PRADO, M.A.M.; ARAÚJO, D.A.M. (-)-Carvone activates TRPV1 channels in DRG neurons and TRPV1-expressing HEK cells. In: XXVI Reunião Anual da FeSBE - FeSBE 2011. Inflamação e dor, 17.213. Rio de Janeiro – RJ, 2011.

**Obs.:** Trabalho selecionado pela SBBf para concorrer ao prêmio Roberto Alcântara Gomes, durante a XXVI Reunião Anual da FeSBE.

### 2 TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

#### 2.1 Artigos publicados em periódicos

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P.; ARAUJO, A.A.S.; ONOFRE, A. C.S.; GELAIN, D.P.; GONÇALVES, J.C.R. ; ARAUJO, D.A.M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BONJARDIM, L.R. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **Journal of Orofacial Pain**, v. 24, p. 305-312, 2010.

ALVES, A.M.H.; GONÇALVES, J.C.R.; CRUZ, J.S.; ARAUJO, D.A.M. Evaluation of the sesquiterpene (-)-alpha-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neuroscience Letters**, v. 412, p. 11-15, 2010.

ALMEIDA, R.N.; ARAUJO, D.A.M.; GONÇALVES, J.C.R.; MONTENEGRO, F.C.; SOUSA, D.P.; LEITE, J.R.; MATTEI, R.; BENEDITO, M.A.C.; DECARVALHO, J.G.B.; CRUZ, J.S.; MAIA, J.G. Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 440-443, 2009.

GONÇALVES, J.C.R.; OLIVEIRA, F.S.; BENEDITO, R.B.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAUJO, D.A.M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1017-1020, 2008.