

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Coordenadoria Especial de Farmacologia
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

**EVIDÊNCIAS SOBRE O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES VANILÓIDES
NAS AÇÕES BIOLÓGICAS PRODUZIDAS PELOS SESQUITERPENOS
POLIGODIAL E DRIMANIAL**

Eunice André

Tese de doutorado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para obtenção do
Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

***A vida é um milhão de novos começos,
movidos pelo desafio sempre novo de
viver e fazer todo sonho brilhar
(Anônimo).***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor João B. Calixto, pelo apoio, orientação, amizade, confiança e incentivo demonstrado ao longo do desenvolvimento deste projeto,

Aos professores do Departamento de Farmacologia,

A prof. Ana Maria soares de Arruda, por ter despertado em mim o interesse pela ciência (in memorian),

Ao professor Pierangelo Geppetti pela orientação técnico-científico ofertado durante a minha estada em seu laboratório na Universidade de Ferrara,

À equipe do laboratório do professor Pierangelo Geppetti, Marcello Trevisani, Bárbara Campi, David Grazzieri, Chiara Manni e Selena Harrison pela amizade, paciência e colaboração neste projeto,

Ao amigo Juliano Ferreira, pela orientação e valiosas sugestões oferecidas durante o desenvolvimento deste projeto,

Aos queridos amigos de hoje e sempre: Maria Fenanda de Paula Werner, Daniela Cabrini, Juliano Ferreira, Candida Kassuya, Fabiane Lunardi, Daniela Leite, Alessandra Beirith, Michel Otuki e Valfredo Schlemper, por tornarem cada momento da minha vida momentos felizes e maravilhosos,

Aos meus pais, por acreditarem no meu ideal,

A minha irmã Suzete, por me apoiar em todas as minhas decisões ao longo da minha vida,

A Luciana Gemin, pela amizade eterna,

Ao Pedro e toda a equipe do biotério, pelo cuidado com os animais,

A CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	I
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Identificação dos receptores vanilóides	3
1.2. Utilização dos vanilóides na clínica e seu potencial terapêutico	11
1.3. Novos agonistas naturais de receptores vanilóides	12
1.4. Efeitos biológicos da <i>Drymis winteri</i> e dos sesquiterpenos poligodial e drimanial	14
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Animais	19
3.2. Isolamento e purificação dos compostos	19
3.3. Experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> realizados com ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial e drimanial	19
3.3.1. Nocicepção induzida pela formalina em ratos tratados durante o período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial	20
3.3.2. Hiperalgisia térmica e extravasamento plasmático induzido pela capsaicina em ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial	21
3.3.3. Hiperalgisia térmica e edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial	22
3.3.4. Ensaio de união específica para a [³ H]resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial e drimanial	22
3.3.5. Análise do conteúdo protéico do receptor TRPV1 por imunodeteção no gânglio da raiz dorsal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial	23
3.3.6. Ensaio de união específica para a [³ H]resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos adultos não tratados no período neonatal	25
3.3.7. Captação de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de ratos	25
3.3.8. Medida do aumento de cálcio intracelular em cultura de neurônios do gânglio do nervo trigêmeo de rato e em células HEK293 transfectadas com o TRPV1 humano (hTRPV1)	26
3.3.9. Bexiga isolada de rato	28
3.4. Drogas	30
3.5. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial na nocicepção induzida pela formalina	33
4.2. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou	35

drimanial na hiperalgesia térmica e no extravasamento plasmático induzido pela capsaicina	
4.3. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial na hiperalgesia térmica e no edema de pata induzido pelo CFA	37
4.4. Ensaio de união específica para a [³ H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial	39
4.5. Análise da presença do receptor TRPV1 no gânglio da raiz dorsal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial pela técnica de <i>Western blot</i>	40
4.6. Efeito do poligodial e drimanial na união específica para a [³ H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos	42
4.7. Efeito do poligodial e do drimanial na captação de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de ratos	44
4.8. Efeito do poligodial e do drimanial no aumento de cálcio intracelular em culturas de neurônio do gânglio trigêmio de rato	45
4.9. Efeito do poligodial e do drimanial no aumento de cálcio intracelular em células HEK293 transfectadas com hTRPV1	48
4.10. Efeito do SR140333, SR48968, capsazepina e a iodo-resiniferatoxina na contração induzida pelo poligodial e o drimanial na bexiga urinária de rato	50
4.11. Efeito do vermelho de rutênio sobre a contração induzida pelo poligodial e o drimanial na bexiga urinária de rato	53
5. DISCUSSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ABREVIações

12-HPETE - hidroxiperoxieicosatetraenóico

AC - adenilato ciclase

AEA – anandamida

ARA-C - citosina-b-D-arabino-furanosídeo

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BSA - soro albumina bovina

AMPC - adenosina monofosfato cíclico

CFA - adjuvante completo de Freund

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DAG - diacil glicerol

DMEM - Eagle modificado por Dulbecco

EP₁ e EP₂ - receptores de prostanóides tipo 1 e 2

GRD - gânglio da raiz dorsal

HEK293 - células embrionárias de rim humano

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

NADA - N-araquidonoil-dopamina

NBT - azul de nitro tetrazolium

NGF - fator de crescimento derivado do nervo

NO - óxido nítrico

P₂Y – receptor purinérgico do tipo 2Y

PAR2 – receptor ativado por proteases tipo 2

PBS - salina tamponada com fosfato

PIP₂ -fosfatidil inositol-4,5 bifosfato

PKA - proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PLC- fosfolipase C

RTX - resiniferatoxina

SNC - Sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

TrK - receptor de tirosina quinase

TRP - *transient receptor potential*

TRPV1 - receptor vanilóide do tipo 1

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Propriedades de alguns canais iônicos envolvidos na transdução térmica	08
Figura 1- Modelo estrutural do TRPV1 clonado	06
Figura 2- Possíveis mecanismos envolvidos na ativação do TRPV1	10
Figura 3- Estrutura química da capsaicina, resiniferatoxina, poligodial e drimanial	13
Figura 4- Influência do tratamento neonatal de ratos com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial, na primeira fase (0 – 5 minutos) e na segunda fase (20 – 50 minutos) da nocicepção induzida pela formalina.	33
Figura 5- Resposta basal à estimulação térmica. Hiperalgisia térmica e extravasamento plasmático induzido pela injeção intraplantar de capsaicina em ratos tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial	35
Figura 6- Resposta basal à estimulação térmica. Hiperalgisia térmica e edema de pata induzido pela injeção intraplantar de CFA em ratos tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial	37
Figura 7- Influência do tratatamento neonatal com o veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial na densidade de sítios de ligação específica para a [³ H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos	38
Figura 8- Figura representativa da imunodeteccção dos níveis da proteína TRPV1 em ratos tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial. Quantificação da proteína do TRPV1 no GRD de ratos tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial	40
Figura 9- Ensaio de competição para a união específica da [³ H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos induzida pela capsaicina, pelo poligodial ou drimanial	42

Figura 10- Efeito do KCl, da capsaicina, do poligodial ou drimanial na captação de cálcio em fração vesicular na medula espinhal de rato	43
Figura 11- Efeito do poligodial e do drimanial no aumento de cálcio intracelular em células do gânglio do nervo trigêmeo de ratos	45
Figura 12- Traçado típico da mobilização de cálcio intracelular induzido pelo poligodial e drimanial em cultura de neurônios do gânglio do nervo trigêmeo quando comparado com o veículo	46
Figura 13- Efeito do poligodial e do drimanial sobre o aumento de cálcio intracelular em células HEK293 transfectadas com o hTRPV1	48
Figura 14- Influência de antagonistas de receptores NK_1 (SR140333) e NK_2 (SR48968) ou dos antagonistas do receptor TRPV1, a capsazepina e a iodo-resiniferatoxina sobre os efeitos contráteis do poligodial em bexiga isolada de rato.	50
Figura 15- Influência de antagonistas de receptores NK_1 (SR140333) e NK_2 (SR48968) ou dos antagonistas do receptor TRPV1, a capsazepina e a iodo-resiniferatoxina sobre os efeitos contráteis do drimanial em bexiga isolada de rato.	51
Figura 16- Influência do antagonista não seletivo para o TRPV1, o vermelho de rutênio sobre os efeitos contráteis do poligodial ou do drimanial em bexiga isolada de rato.	53

RESUMO

O estudo realizado com os sesquiterpenos poligodial e drimaniol obtidos da *Drymis winteri* demonstrou que o tratamento de ratos no período neonatal com ambos os compostos provocou redução significativa da nocicepção neurogênica, da hiperalgesia térmica e do extravasamento plasmático causados, respectivamente, pela formalina, pelo adjuvante completo de Freund e pela capsaicina. Esse efeito foi semelhante ao observado nos animais tratados no período neonatal com capsaicina. Além disso, a exemplo da capsaicina, o tratamento de ratos no período neonatal com poligodial ou drimaniol causou significativa redução ou alteração na afinidade nos sítios de ligação do agonista ultrapotente de receptores vanilóides (TRPV1), a resiniferatoxina, em ensaios de união específica utilizando membranas da medula espinhal. O tratamento neonatal com capsaicina, mas não com o poligodial ou com o drimaniol resultou em grande diminuição da expressão do receptor vanilóide (TRPV1) no gânglio da raiz dorsal. Em adição, o poligodial, o drimaniol e a capsaicina promoveram aumento da captação de cálcio em frações vesiculares, bem como inibiram a união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de rato. Ambos sesquiterpenos causaram mobilização de cálcio intracelular em cultura de neurônio do nervo trigêmeo de rato. No entanto, em células HEK293 transfectadas com o TRPV1 humano (hTRPV1), ambos sesquiterpenos não foram capazes de causar mobilização de cálcio intracelular. Na bexiga isolada de rato, a contração induzida pelo poligodial e drimaniol foi inibida pelos antagonistas dos receptores taquicinérgicos NK₁ e NK₂ (SR140333 e SR48968, respectivamente). Por outro lado, a capsazepina ou a iodo-resiniferatoxina (antagonistas do TRPV1) causaram

inibição parcial da contração induzida pelo poligodial, mas não daquela causada pelo drimanial. Porém, quando o vermelho de rutênio, um antagonista não seletivo do TRPV1 foi utilizado, observamos que a contração na bexiga isolada de rato induzida pelo poligodial ou drimanial foi inibida de maneira significativa.

Analisados em conjunto, esses resultados sugerem que apesar de alguns efeitos induzidos pelo poligodial e drimanial serem semelhantes aos causados pelo agonista vanilóide, a capsaicina, estas ações parecem não estar exclusivamente relacionadas com ativação direta do TRPV1. Sendo assim, esses sesquiterpenos podem estar atuando em outros alvos farmacológicos ou até mesmo em outrosreceptores da família TRP.

ABSTRACT

This study was designed to assess the participation of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the biological actions caused by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol. The results demonstrated that the neonatal treatment of rats with capsaicin, polygodial or drimaniol produced significant inhibition of the first phase and, to a lesser extent, the second phase of formalin-induced nociception. In addition all 3 treatment significantly reduced Complete Freund's Adjuvant and capsaicin-induced hyperalgesia compared with vehicle-treated rats. Moreover, both sesquiterpenes inhibited plasma extravasation induced by capsaicin injection. The neonatal treatment with capsaicin, polygodial or drimaniol significantly also decreased [³H]-resiniferatoxin binding sites in the rat spinal cord, but only capsaicin neonatal treatment was able to significantly reduce TRPV1 expression in dorsal root ganglia (DRG). These results extend our previous findings demonstrating that neonatal treatment of rats with polygodial or drimaniol, similar to that reported for capsaicin, produced persistent antinociception in adult animals associated with TRPV1 down-regulation in the spinal cord, but not TRPV1 expression in DRG. In addition to their similarity with capsaicin, both compounds displaced the specific binding sites of [³H]-resiniferatoxin in rat spinal cord membranes. Likewise, capsaicin, polygodial, drimaniol and KCl promoted consistent ⁴⁵Ca²⁺ uptake in rat spinal cord synaptosomes. Moreover, polygodial, drimaniol and capsaicin were also able to markedly increase intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) levels in cultured rat trigeminal neurones. Unlike to capsaicin, both compounds failed to induce an increase in [Ca²⁺]_i in human TRPV1-expressing HEK293 cells. Taken together these results, apart from some similarities to

capsaicin effects, polygodal and drimaniol seem not to be exclusively related with a direct interaction with TRPV1. Thus, these sesquiterpenes could be acting through different pharmacological targets including other receptors in the TRP channel family, a hypothesis that deserves further studies.

PARTE DESTES RESULTADOS FORAM PUBLICADOS:

André, E., Ferreira, J., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodal and drimaniol in rats. *Neuropharmacology*, 46: 590-597, 2004.

André, E., Campi, B., Trevisani, M., Ferreira, J., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B and Pierangelo Geppetti. Characterisation of sesquiterpenes polygodal and drimaniol as vanilloid receptor agonists, *Neuropharmacology*, (submitted for publication)

1. INTRODUÇÃO

As plantas do gênero *Capsicum* pertencem à família *Solanaceae*, e são originárias das Américas Central e do Sul. Cerca de vinte espécies de plantas estão incluídas nessa família e encontram-se distribuídas em todo o mundo, porém, somente cinco são cultivadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pendulum* e *C. pubescens*. As espécies de *Capsicum* são conhecidas popularmente como pimenta vermelha, e sua utilização, tanto na culinária como na medicina popular, é relatada desde 7000 a.C (para revisão, ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999; CALIXTO *et al.*, 2001). A procura da substância pungente presente nas espécies do gênero *Capsicum* iniciou em 1810, mas somente em 1846 Thresh isolou o princípio ativo denominado capsaicina, enquanto a elucidação da estrutura química dessa substância foi determinada por Nelson apenas em 1919 (NELSON, 1919 e 1920; para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

Na medicina popular, as espécies de *Capsicum* são utilizadas para aumentar o apetite, tratamento de prurido, úlceras gástricas, reumatismo, constipação e para aliviar dores de dente (HANGAY, 1887; WHITTET, 1968). No final do século XIX, o professor de medicina James Sawyer (1891) obteve excelentes resultados com o uso de tinturas de capsaicina no tratamento de reumatismo e bronquite crônica. Outros relatos encontrados na literatura demonstram que a capsaicina era usada topicamente em picadas de serpentes, internamente no tratamento de sintomas urinários causados pelo diabetes e ainda como afrodisíaco (para revisão, ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

Por apresentar sabor picante, a pimenta é muito utilizada como condimento na culinária e estima-se que ela seja consumida diariamente por mais de um quarto

da população mundial. Poderia ser coincidência, mas dois farmacologistas da Hungria (país conhecido por sua comida picante) transformaram a capsaicina de uma curiosidade culinária em uma das principais ferramentas farmacológicas para o estudo da dor (SZALLASI, 1994). Na década de 50, Nicholas Jancsó (1955) demonstrou que a aplicação de capsaicina na pele humana causou inicialmente estimulação de neurônios sensoriais produzindo sensação de dor em queimação e vasodilatação. Essa estimulação de neurônios sensoriais induzido pela capsaicina também produziu liberação de neuropeptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) de terminais nervosos. Esse fenômeno é seguido por um período que o autor chamou de dessensibilização (JANCSÓ e JANCSÓ-GABOR 1949; JANCSÓ, 1955). Durante esse período refratário o indivíduo é relativamente resistente à capsaicina e a outros estímulos dolorosos (JANCSÓ e JANCSÓ-GABOR 1949; JANCSÓ, 1955). No entanto, a aplicação repetida de capsaicina induz dessensibilização persistente do nociceptor polimodal, que foi atribuída provavelmente à estimulação de um subgrupo de neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina, causando aumento de cálcio intracelular e liberação de neuropeptídeos com conseqüente depleção dos mesmos (JANCSÓ *et al.*, 1967). A sensibilidade a capsaicina e a outros estímulos dolorosos retorna ao normal duas semanas após a interrupção do tratamento (JANCSÓ e JANCSÓ-GABOR 1949, JANCSÓ, 1955). Essa dessensibilização induzida pela capsaicina depende não somente da dose, mas também da via de administração e da susceptibilidade dos neurônios aferentes primários à capsaicina ou a outros vanilóides (LYNN, 1990). De fato, em ratos adultos, essa insensibilidade permanecia por semanas ou meses após a administração sistêmica de capsaicina. No entanto, quando a capsaicina era administrada sistemicamente em ratos ou camundongos neonatos, observou-se

degeneração seletiva de fibras C e de algumas fibras A δ (efeito neurotóxico), associada à diminuição irreversível do número de neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro (JANCSÓ *et al.*, 1977; para revisão, ver HOLZER, 1991). Esse processo de dessensibilização e neurotoxicidade tem justificado o uso clínico de preparações de capsaicina como analgésico (SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

1.1. Identificação dos receptores vanilóides

O fato da capsaicina e substâncias relacionadas a ela ativarem seletivamente um grupo específico de fibras sensoriais sugeria que as ações causadas por essas substâncias poderiam ser mediadas por um sítio de ação específico, presente exclusivamente em neurônios aferentes que detectam e transmitem a nocicepção (BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990; HOLZER, 1991). Estudos com preparações de fibras sensoriais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o efeito excitatório causado pela capsaicina é causado principalmente pelo aumento do influxo de cálcio e, em menor extensão, por influxo de sódio (MARSH *et al.*, 1987; RANG *et al.*, 1987). O influxo de cátions causa despolarização da membrana (BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990), gerando assim um potencial de ação (BEVAN e DOCHERTY, 1993) que é propagado até o sistema nervoso central (SNC), por meio dos neurônios sensíveis à capsaicina, ocasionando uma sensação de ardência ou dor (HOLZER, 1991). Esse influxo de cátions causa também liberação de vários neuropeptídeos, incluindo as taquicininas, o CGRP e a somatostatina (GAMSE *et al.*, 1981; AUGUSTINE *et al.*, 1987). A substância P e o CGRP, liberados dos nervos sensoriais, estão envolvidos em processos patológicos como, por exemplo, a inflamação neurogênica (HOLZER, 1988; GEPPETTI e HOLZER, 1996) e em

processos fisiológicos, como o relaxamento de esfíncteres e na produção de muco gástrico (LIPPE *et al.*, 1989; HOLZER *et al.*, 1990; UCHIDA *et al.*, 1991). No entanto, ainda não havia evidências de que esse receptor para a capsaicina poderia ser operado por algum ligante endógeno (BEVAN *et al.*, 1987; BEVAN e SZOLCSÁNYI, 1990). Com base em evidências indiretas, alguns autores sugeriram que a capsaicina teria um sítio específico de reconhecimento na membrana, o qual promoveria a ativação de canais iônicos permeáveis a cátions não seletivos (BUCK e BURKS, 1986; HOLZER, 1991).

Tentativas de caracterização de um receptor para capsaicina mediante o uso de técnicas de união específica utilizando análogos da capsaicina não obtiveram resultados promissores, devido principalmente à alta lipofilicidade e à baixa afinidade desses compostos (a capsaicina age *in vitro* com potência micromolar ou submicromolar), quando comparado com outros ligantes, marcados radioativamente, que atuam geralmente em nanomolar ou picomolar (SZE BENI *et al.*, 1978; JAMES *et al.*, 1988). Além desses problemas, vários grupos não obtiveram sucesso em sintetizar análogos da capsaicina com maior potência (SZALLASI, 1994). Dessa forma, iniciou-se, na última década uma procura por análogos da capsaicina com maior potência.

Na procura de novos promotores de tumor, semelhantes aos ésteres de forbol, Hergenbahn e colaboradores (1975) isolaram da planta *Euphorbia resinifera* (Euphorbiaceae) um diterpeno extremamente irritante, chamado pelos autores de resiniferatoxina. No entanto, a resiniferatoxina não apresentou atividade promotora de tumor, diferentemente dos outros ésteres de forbol. Além disso, a resiniferatoxina, não foi capaz de deslocar a união específica para os ésteres de forbol (DRIEDGER e BLUMBERG, 1980). Comparações da relação estrutura-atividade entre a

resiniferatoxina e vários outros produtos naturais irritantes demonstraram que a resiniferatoxina e a capsaicina têm um grupamento homovanílico em comum, que é essencial para a atividade biológica de ambas as substâncias (SZALLASI e BLUMBERG, 1990a).

A resiniferatoxina produz várias ações farmacológicas semelhantes às da capsaicina, incluindo pungência, inflamação neurogênica e diminuição da temperatura corporal (SZALLASI e BLUMBERG, 1989). No entanto, algumas ações causadas pela resiniferatoxina como, por exemplo, seu efeito dessensibilizante é até mil vezes mais potentes do que as observadas para a capsaicina (MAGGI *et al.*, 1990; SZALLASI, 1994). Essa alta potência apresentada pela resiniferatoxina possibilitou o estudo do sítio de ação da capsaicina. As evidências iniciais mostravam que a resiniferatoxina marcada radioativamente ligava-se em sítios específicos no gânglio da raiz dorsal (GRD) de rato, uma ligação que era deslocada competitivamente e seletivamente pela capsaicina (SZALLASI e BLUMBERG, 1990b). Essa foi a primeira demonstração inequívoca com relação à existência de receptores para a capsaicina.

A ligação específica para a [³H]-resiniferatoxina realizada em ratos também demonstrou que esses sítios de ligação estavam presentes em vários outros tecidos periféricos, incluindo o nervo ciático e o vago (ÁCS *et al.*, 1994), a bexiga urinária (ÁCS *et al.*, 1994, 1996), a uretra (PARLANI *et al.*, 1993), a traquéia, os brônquios e o cólon (SZALLASI *et al.*, 1993, GOSO *et al.*, 1993). Como a resiniferatoxina e a capsaicina têm um grupamento homovanilil em comum (a resiniferatoxina é um éster e a capsaicina é uma amina), o receptor e as substâncias capazes de se ligarem a esse receptor foram denominados vanilóides (SZALLASI e BLUMBERG, 1990a). Outra evidência adicional sobre a existência de receptores vanilóides foi obtida com

o estudo da relação estrutura-atividade para a capsaicina e análogos, o que permitiu a descoberta da capsazepina, um antagonista sintético seletivo e competitivo para os efeitos causados tanto pela capsaicina como pela resiniferatoxina (URBAN e DRAY, 1991; BEVAN *et al.*, 1992). Esse antagonista, Por exemplo, foi capaz de bloquear o influxo de cálcio causado pela capsaicina em neurônios do GRD de rato, em experimentos eletrofisiológicos *in vitro* (OH *et al.*, 1996).

A confirmação definitiva da existência de receptores vanilóides surgiu com os estudos de biologia molecular e a clonagem do receptor vanilóide do tipo 1 (TRPV1), a partir do DNAc obtido do GRD (CATERINA *et al.*, 1997). O gene do TRPV1 codifica uma proteína contendo 838 aminoácidos e 95 kDa de massa molecular. Essa proteína forma um canal iônico não seletivo que pertence à família de receptores que geram um potencial transitório (*transient receptor potential* - TRP). O TRPV1 é formado pela união de quatro subunidades, cada uma contendo seis domínios transmembranais, dois terminais citosólicos em cada extremidade da molécula e um possível poro entre o quinto e o sexto domínio (KEDEI *et al.*, 2001) (Figura 1).

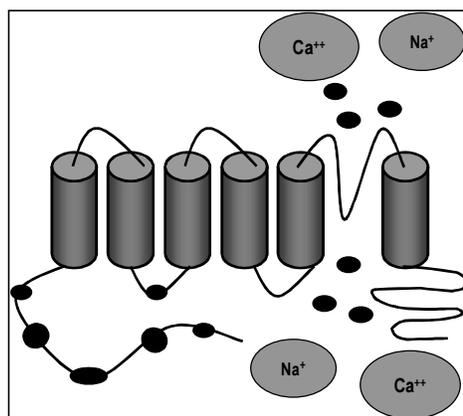


Figura 1. Modelo estrutural do TRPV1 clonado (Adaptado de Caterina *et al.*, 1997).

Uma alta expressão desses receptores foi evidenciada nos neurônios do GRD e no nervo trigêmio (CATERINA *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 1998). O TRPV1 foi detectado tanto nos terminais centrais de neurônios aferentes primários (corno dorsal da medula espinhal e núcleo caudal do complexo trigeminal espinhal) como nas terminações periféricas (pele e córnea) de mais de 50% dos neurônios aferentes primários estudados (GUO *et al.*, 1999). Outros estudos demonstram que o RNAm para o TRPV1 é também expresso em diversas áreas do sistema nervoso central incluindo o sistema límbico, corpo estriado, hipotálamo, substância negra, núcleo talâmico paraventricular, formação reticular, locus coeruleus e cerebelo (MEZEY *et al.*, 2000). No entanto, existem evidências de que o RNAm e a proteína do TRPV1 também são produzidos e expressos em células não neuronais, incluindo células epiteliais e urotélio (BIRDER *et al.*, 2001), queratinócitos (INOUE *et al.*, 2002) e em células gliais (DOLY *et al.*, 2004).

A família TRP pode ser subdividida em três subclasses TRPC, TRPM e TRPV (CLAPHAM *et al.*, 2003) (Tabela1), sendo que o TRPV1 pertence ao último grupo (MONTELL *et al.*, 2002). Além do TRPV1, outros membros da família de receptores TRP são expressos em neurônios sensoriais (vide tabela 1). Por exemplo, mais recentemente, foi clonado um outro canal TRP chamado de ANKTM1 que responde ao frio ($\leq 17^{\circ}\text{C}$), mas não ao mentol (TRPM8) (PEIER *et al.*, 2002). Os neurônios sensoriais que expressam TRPV1, mas não aqueles que expressam o TRPM8, parecem também expressar o ANKTM1 (MCKEMY *et al.*, 2002; PEIER *et al.*, 2002). O TRPV1 é considerado um termosensor e pode ser ativado por substâncias exógenas irritantes, além da capsaicina e da resiniferatoxina. Recentemente, foi demonstrado que as ações do etanol em nociceptores (TREVISANI *et al.*, 2002) são aparentemente mediadas via ativação do TRPV1.

Tabela 1

Propriedades de alguns canais iônicos envolvidos na transdução térmica					
Nomenclatura	Outros nomes	Sensibilidade a temperatura	Agonistas	antagonistas	Distribuição tecidual
TRPV1	VR1	$\geq 42^{\circ}\text{C}$	capsaicina, produtos da via da lipoxigenase pH, RTX, etanol, NADA e anandamida	vermelho de rutênio capsazepina	SNP, cérebro, medula espinhal, pele, língua, e bexiga
TRPV2	VRL1	$\geq 52^{\circ}\text{C}$	Fator 1 de crescimento tipo insulina	vermelho de rutênio	SNP, cérebro, medula espinhal
TRPV3	VRL3	$\geq 33^{\circ}\text{C}$	-	vermelho de rutênio	SNP (humano), pele.
TRPV4	OTRPC4 VR-OAC TRP12 VRL2	$\sim 27-42^{\circ}\text{C}$	Hipotonicidade, 4- α forbol	vermelho de rutênio, gadolinium	Rim, SNP, pele, cérebro, fígado, traquéia, coração,
TRPM8	CMR1	$\leq 25^{\circ}\text{C}$	Mentol, icilina, eucaliptol,	vermelho de rutênio	SNP, próstata (humana)
ANKTM1	TRPA1	$\leq 17^{\circ}\text{C}$	Icilina, aldeído cinâmico	vermelho de rutênio	SNP

SNP, sistema nervoso periférico, N-araquidonoil-dopamina, NADA, RTX, resiniferatoxina. Adaptado de Patapoutian *et al.*, (2003).

Além dessas substâncias exógenas, o TRPV1 pode ser ativado endogenamente por altas temperaturas ($> 43^{\circ}\text{C}$) e por baixo pH ($< 6,5$), o que contribui para a detecção de estímulos térmicos e químicos nocivos pelos neurônios sensoriais primários (CATERINA *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 1998). Porém, as correntes nativas induzidas em neurônios sensoriais pelo calor ou por prótons não têm todas as características das correntes mediadas pela ativação de receptores vanilóides expressos em sistemas heterólogos, o que sugere que outras proteínas diferentes do TRPV1 possam ser responsáveis pela detecção desses estímulos (para revisão, ver CATERINA e JULIUS, 2001). Estudos têm demonstrado que a capsaicina liga-se no lado intracelular do receptor TRPV1, precisamente entre os domínios transmembranais dois e três desse receptor (JUANG *et al.*, 1999). O fato é que a capsaicina é uma molécula que apresenta similaridade estrutural com vários

mediadores lipídicos endógenos, o que sugere que essas substâncias podem ser os ativadores naturais do receptor TRPV1. Dados da literatura demonstram que vários mediadores lipídicos como a anandamida (ZYGMUNT *et al.*, 1999), a *N*-araquidonoil-dopamina (NADA) (HARRISON *et al.*, 2003) ou os produtos derivados da lipoxigenase (HWANG *et al.*, 2000), principalmente o ácido hidroxiperoxieicosatetraenóico (12-HPETE), ativam receptores TRPV1 naturais ou expressos em sistemas heterólogos *in vitro* (Figura 2). Todavia, existem poucas informações acerca da regulação da atividade do receptor TRPV1 e da produção de agonistas endógenos em modelos experimentais *in vivo*. A atividade do TRPV1 pode ser modulada pela ação de mediadores inflamatórios, incluindo bradicinina, prostaglandinas, adenosina trifosfato (ATP), fator de crescimento derivado do nervo (NGF) e (Figura 2). A ativação da fosfolipase C por receptores metabotrópicos ativados por esses mediadores causa degradação de fosfolípidios de membrana, como o fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PIP₂), os quais exercem efeito inibitório na ativação do TRPV1 (PRESCOTT e JULIUS, 2003). Além disso, esses mediadores podem fosforilar o receptor via ativação da proteína quinase C (PKC) ou através da proteína quinase A (PKA) (SZALLASI e BLUMBERG, 1999; PREMKUMAR e AHERN, 2000). Essa modulação produz potencialização da resposta a agonistas exógenos (capsaicina ou temperatura) ou endógenos (anandamida, pH) (VELLANI *et al.*, 2001). Recentemente, Ferreira *et al.*, (2004), demonstraram que a ação nociceptiva causada pela bradicinina, quando administrada na pata de camundongos, pode ser mediada não somente por uma ativação direta de neurônios sensoriais, mas também pela liberação indireta de mediadores lipídicos que ativam e sensibilizam o TRPV1. De fato, o TRPV1 tem sido considerado um integrador molecular de estímulos nocivos no terminal periférico de nervos sensoriais primários

envolvidos na sinalização da dor (JULIUS e BASBAUM, 2001).

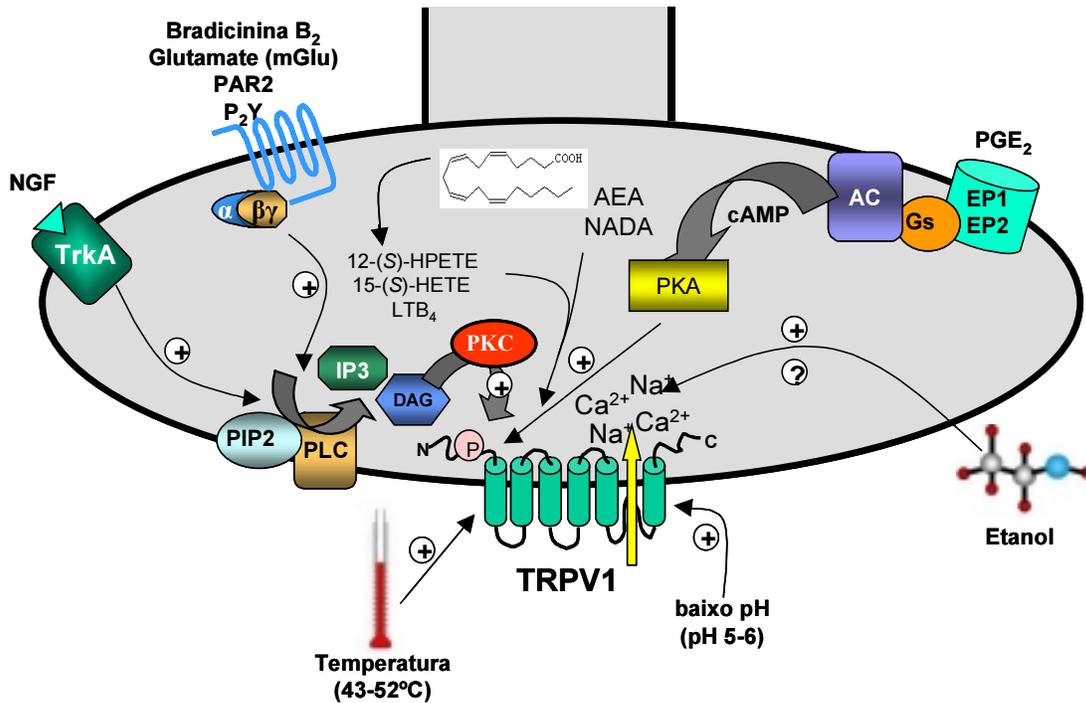


Figura 2. Possíveis mecanismos envolvidos na ativação do TRPV1 (GEPPETTI e TREVISANI, 2004). PLC- fosfolipase C, PKC- proteína quinase C, PKA- proteína quinase A, DAG- diacil glicerol, PIP₂- fosfatidil inositol-4,5 bifosfato, cAMP-adenosina monofosfato ciclico, AC- adenilato ciclase, AEA- anandamida, NADA- *N*-araquidonoil-dopamina, NGF- fator do crescimento do nervo, Trk- receptor de tirosina quinase, EP₁ e EP₂- receptores de prostanóides tipo 1 e 2, PAR2 - receptor ativado por protease, P₂Y - receptor purinérgico

Esses dados foram confirmados por estudo de deleção gênica, no qual camundongos nocautes para o TRPV1 apresentaram respostas normais a estímulos mecânicos nocivos, mas não apresentaram comportamento de dor quando tratados por agonistas vanilóides, além de apresentarem sensibilidade térmica reduzida no local da inflamação (CATERINA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 2000). Mais recentemente, estudos farmacológicos (WALKER *et al.*, 2003) demonstraram que a capsazepina é capaz de reverter a hiperalgesia mecânica em modelos de inflamação e dor neuropática em cobaias. Dessa forma, parece evidente que o TRPV1 é essencial em processos de hiperalgesia térmica e mecânica associados a processos inflamatórios e dano tecidual (CATERINA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 2000).

1.2. Utilização dos vanilóides na clínica e seu potencial terapêutico

Nos últimos anos, a capsaicina tornou-se um instrumento importante nas pesquisas biomédicas. O interesse científico por esse composto é motivado pelo fato de que a capsaicina exerce ações peculiares sobre uma subpopulação de neurônios sensoriais que transmitem a informação nociceptiva. As evidências de um importante papel fisiológico dessa subpopulação de neurônios também têm contribuído para o aumento do número de trabalhos nessa área. Os neurônios sensíveis à capsaicina parecem estar relacionados a diversas doenças. De fato, a capsaicina é utilizada clinicamente no tratamento de diversas patologias, incluindo a hiper-reflexia ou hipersensibilidade da bexiga urinária, estados de dor neuropática, como neuralgia pós-herpética, dor neuropática causada pela diabetes, síndrome da dor pós-mastectomia, osteoartrite e artrite reumatóide (SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

Na clínica, a capsaicina tem sido utilizada principalmente em pacientes que apresentam hiper-reflexia de bexiga urinária causada por lesão na medula espinhal.

Nessa patologia, a instilação de capsaicina intravesical é benéfica por diminuir a sensibilidade das fibras C envolvidas no reflexo de micção (DE GROAT, 1997; CRUZ, 1998).

As propriedades antinociceptivas da capsaicina demonstradas recentemente já haviam sido evidenciadas no século XIX, quando ela era usada para tratar dor de dente. Outros usos incluem o tratamento da rinite vasomotora, parestesia e outras patologias (para revisão, ver SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

1.3. Novos agonistas naturais de receptores vanilóides

Apesar dos dialdeídos insaturados não apresentarem estrutura química semelhante à da capsaicina (Figura 3), estes compostos promovem muitas ações semelhantes a capsaicina (SZALLASI *et al.*, 1996, 1998). Isso fez com que alguns pesquisadores começassem a estudar suas possíveis interações com os receptores vanilóides. Aproximadamente 80 terpenóides contendo um grupamento 1,4-aldeído α,β -insaturado funcional foram isolados e identificados em diversas fontes naturais, incluindo plantas, algas, esponjas, moluscos, insetos e fungos (JONASSOHN e STERNER, 1997). Diversos dialdeídos insaturados, tais como o cinamolido, o cinamodial, o cinamosmolido (isolados da *Cinnamosma fragrans*) e o isoveleral (isolado da *Lactarius vellereus*) também demonstraram pungência e ações farmacológicas semelhantes à da capsaicina (CANONICA *et al.*, 1969). Além dos dialdeídos insaturados, triprenil fenóis (scutigeral), cetonas fenólicas (gingerol) e ácidos graxos insaturados (ácido ricinoleico) também foram descritos como possíveis ativadores do TRPV1 (STERNER e SZALLASI, 1999; DEDOV *et al.*, 2002, LIDA *et al.*, 2003).

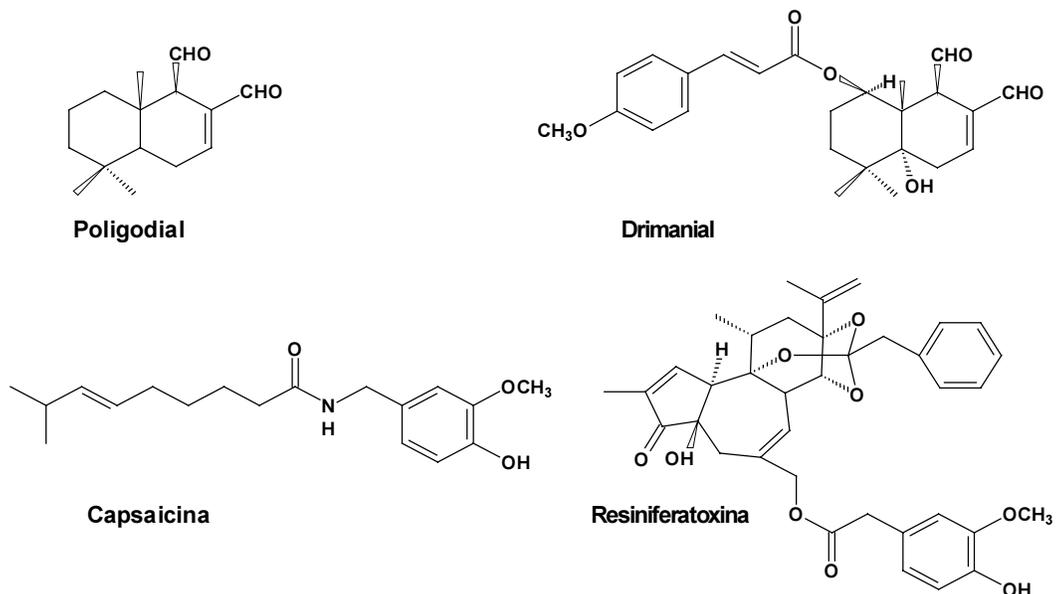


Figura 3. Estrutura química da capsaicina, resiniferatoxina, poligodial e drimaniol.

Apesar dessas observações, a possibilidade dos dialdeídos insaturados atuarem diretamente em receptores TRPV1 somente foi investigada a partir de 1996. Estudos *in vitro*, realizados com o isoveleral, scutigeral, cinamodial e o cinnamosmolide, demonstraram que esses compostos causaram aumento da captação de cálcio em neurônios sensoriais. Esses compostos também apresentaram afinidade quando analisados na ligação específica da [³H]-resiniferatoxina e causaram pungência quando aplicados na língua de humanos (SZALLASI *et al.*, 1996). Recentemente, Ralevic e colaboradores (2003) demonstraram, em células HEK293 transfectadas com TRPV1 de rato e em cultura de GRD de rato, que o isoveleral não é capaz de atuar como um agonista do TRPV1, mas sim como antagonista deste receptor. O fato desses compostos

estarem agindo via ativação do TRPV1 pode representar um alvo importante para o desenvolvimento de novas drogas com potencial analgésico.

1.4. Efeitos biológicos da *Drymis winteri* e dos sesquiterpenos poligodial e drimanial

A *D. winteri* (*Winteraceae*) é encontrada em alguns países da América do Sul, principalmente na região Sul do território brasileiro. Suas folhas e cascas são utilizadas popularmente como estimulante, antiespasmódico, antidiarréico, antipirético, cicatrizante, antiinflamatório, no tratamento da hemorragia uterina e em certas afecções do trato respiratório, bem como na asma brônquica e em alergias (MORTON, 1981; SIMÕES *et al.*, 1986). Além disso, essa planta é também utilizada no tratamento do câncer e de úlceras e como substituto da pimenta na culinária. (PIO CORRÊA, 1978; RICCIERI, 1981; GUPTA, 1995; GRAVES, 1996).

Estudos anteriores demonstraram que o extrato hidroalcoólico da *D. winteri* interfere nas respostas contráteis induzidas por vários mediadores químicos, quando testado no íleo e na traquéia isolados de cobaia (EL SAYAH *et al.*, 1998). Experimentos realizados *in vivo* também demonstraram que o tratamento sistêmico com o extrato da *D. winteri* produz efeitos antiedematogênico, antialérgico e antinociceptivo (TRATSK *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 1998).

Os estudos farmacológicos *in vitro* realizados com o sesquiterpeno poligodial demonstraram que esse composto produz relaxamento dependente da sua concentração, quando testado em vasos com endotélio íntegro (artérias pulmonares de coelhos e cobaias e aorta torácica de coelho) e no corpo cavernoso de coelho (Andre *et al.*, 1999 e 2003). Essas ações parecem envolver a liberação de óxido nítrico (NO) ou substância relacionada ao NO do endotélio vascular, por meio de um

mecanismo dependente da ativação da guanilato ciclase e do aumento dos níveis de GMPc (ANDRÉ *et al.*, 1999 e 2003). Da mesma forma que o extrato de *D. winteri*, o poligodial, administrado em camundongos, tanto por via oral como intraperitoneal, produziu inibição. O efeito foi dependente da dose e de longa duração das contorções abdominais induzidas por ácido acético, caolin e zimozan. Além disso foi verificado que tanto o extrato de *D. winteri* quanto o poligodial foram capazes de inibir a dor neurogênica e inflamatória induzida pela formalina e pela capsaicina em camundongos (MENDES *et al.*, 1998 e 2000).

O poligodial administrado pelas vias intratecal ou intracerebroventricular em camundongos, produziu antinocicepção acentuada nas duas fases da resposta à formalina, indicando um sítio de atuação espinhal ou supra-espinhal. Quando administrado por via oral, o extrato hidroalcoólico da *D. winteri* reverteu completamente a hiperalgesia produzida pela injeção intraplantar de bradicinina ou pela substância P; contudo, não foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ e carragenina (MENDES *et al.*, 1998).

O mecanismo pelo qual o poligodial exerce sua ação antinociceptiva não parece estar relacionado à interação com a via L-arginina – NO nem com receptores GABA_A e GABA_B, ou ainda a ativação de canais de potássio de pequena e grande condutância e canais de K⁺ ativados por ATP. Por outro lado, o sistema opióide (receptores κ e μ), a serotonina, receptores adrenérgicos do tipo α_1 e a ativação de proteínas G_{i/o} sensíveis à toxina pertussis parecem estar envolvidos no mecanismo pelo qual o poligodial produz antinocicepção (MENDES *et al.*, 2000). Curiosamente, a ação do poligodial não produz tolerância cruzada com a morfina e nem é afetada pela adrenalectomia prévia dos animais (MENDES *et al.*, 2000).

Em estudos preliminares, Cechinel Filho *et al.* (1998) e Malheiros *et al.* (2001) demonstraram que outros sesquiterpenos isolados da casca de *D. winteri*, identificados como 1- β -(*p*-metoxinamil)-poligodial e drimantal, também causaram inibição significativa da resposta nociceptiva induzida por ácido acético em camundongos, porém apresentando menor potência em relação ao poligodial. Scheidt *et al.* (2002) demonstraram que o drimantal produziu efeito antinociceptivo pronunciado nos modelos de nocicepção causados pela formalina, capsaicina e pelo glutamato e que esse efeito não foi revertido pela naloxona. No mesmo modelo, foi também observado que o drimantal foi capaz de bloquear de forma efetiva a nocicepção induzida pela injeção intratecal do agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgico (1S,3R)-ACPD em camundongos, mas não quando a indução foi realizada pelos agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA, AMPA ou cainato e pela substância P (SCHEIDT *et al.*, 2002). O drimantal também produziu inibição dependente da concentração da união específica para o [³H]-glutamato, em membranas de córtex de camundongos (aproximadamente 87% na concentração de 30 μ M) (SCHEIDT *et al.*, 2002). Além disso, dados não publicados de nosso laboratório demonstram que o tratamento neonatal de camundongo com capsaicina provoca redução significativa do efeito nociceptivo causado pelo drimantal ou pela própria capsaicina. Adicionalmente, o pré-tratamento dos animais com capsazepina, antagonista do TRPV1, causou reversão significativa do efeito antinociceptivo originado pelo drimantal ou pela capsaicina, na primeira fase da nocicepção induzida pela formalina. Esses resultados em conjunto sugerem que o efeito antinociceptivo causado pelo drimantal parece ser, em parte, mediado por receptores metabotrópicos glutamatérgicos e vanilóides. De fato, estudos recentes têm demonstrado que a estimulação do TRPV1 é um importante passo

para a ativação de neurônios sensoriais induzido pelos receptores metabotrópicos glutamatérgicos (HU *et al.*, 2002).

Esses resultados estabelecem perspectivas para o aproveitamento dos sesquiterpenos poligodial e do drimanial no desenvolvimento de novas drogas analgésicas. Dessa forma, no presente trabalho foi investigada a hipótese de que as ações farmacológicas do poligodial e drimanial poderiam estar relacionadas com os TRPV1.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi investigar, com o emprego de técnicas bioquímicas e farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, alguns dos mecanismos de ação dos sesquiterpenos poligodial e drimanial, enfatizando o possível envolvimento dos receptores vanilóides.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar se o poligodial e o drimanial causam efeito sistêmico antinociceptivo e antiinflamatório semelhante ao da capsaicina, quando administrados durante o período neonatal em ratos;
- Verificar, por meio da técnica de *Western blot*, se o poligodial e o drimanial causam alteração na expressão da proteína TRPV1 em ratos tratados durante o período neonatal com esses compostos;
- Verificar se ambos os compostos interagem com os receptores vanilóides, por meio da técnica de união específica, bem como analisar a capacidade dos mesmos em estimular a captação de cálcio, utilizando frações vesiculares obtidas da medula espinhal de rato;
- Analisar se esses compostos ativam os receptores vanilóides em células HEK293 transfectadas com TRPV1 humano ou em células do gânglio do nervo trigêmio de rato através da técnica de cálcio intracelular.
- Analisar por meio de testes funcionais, *in vitro*, se o poligodial e o drimanial apresentam ações semelhantes aos agonistas de receptores vanilóides.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ratos Sprague-Dawley (Morini, Itália), todos pesando de 200 a 300 g, criados em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração fornecida *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações descritas pelo Comitê de Ética de Uso de Animais Experimentais (CEUA) da UFSC, cadastrado sob os números 263/CEUA e 23080035336-16/UFSC. Os estímulos e o número de animais foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos com as substâncias em estudo.

3.2. Isolamento e purificação dos compostos

O poligodial e o drimanial foram isolados das cascas da *D. winteri* no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, pelo professor Dr. Rosendo A. Yunes, conforme procedimentos previamente descritos (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998; MALHEIROS *et al.*, 2001).

3.3. Experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados com ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial e drimanial

Ratos Wistar neonatos (com 48 h de vida) receberam injeção subcutânea de capsaicina (50 mg/kg), como descrito previamente por Gamse *et al.* (1982). Grupos

adicionais de animais receberam injeção subcutânea de poligodial (150 mg/Kg), drimanial (150 mg/Kg) ou veículo (10 % Tween e 10 % etanol, em salina tamponada com fosfato-PBS). A escolha das doses de poligodial e drimanial baseou-se em experimentos preliminares. Seis a oito semanas após o tratamento neonatal, os ratos foram analisados através de estudos *in vivo* e *in vitro*.

3.3.1. Nocicepção induzida pela formalina em ratos tratados durante o período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial

O teste da formalina foi realizado conforme descrito por Dubuisson e Dennis (1977), com pequenas modificações. Os ratos que receberam no período neonatal veículo (PBS), capsaicina, poligodial ou drimanial foram observados simultaneamente por 50 minutos, após administração da injeção intraplantar de 50 µl de formalina (2,5 % de formalina) na pata direita. O tempo em que o animal permaneceu agitando, lambendo ou recolhendo a pata injetada foi medido com o auxílio de um cronômetro e considerado como índice de nocicepção. A resposta nociceptiva inicial teve um pico em cinco minutos após a injeção (primeira fase) e foi seguida por um segundo pico que iniciou 20 minutos após injeção de formalina (segunda fase). Essa segunda fase foi observada por até 50 minutos após a injeção de formalina.

3.3.2. Hiperalgisia térmica e extravasamento plasmático induzido pela capsaicina em ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial

Os animais tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial, quando adultos, foram anestesiados com éter e, em seguida, receberam injeção intraplantar na pata direita de 100 μ l de capsaicina (20 nmol/pata). Dez minutos após a injeção, a hiperalgisia térmica foi avaliada como a redução da latência do tempo de retirada da pata, de acordo com o método descrito por Hargreaves *et al.* (1988). Os ratos foram colocados em uma caixa de acrílico transparente (22 x 18 x 13 cm), em uma superfície elevada e, após 15 minutos de aclimatização antes da realização do teste, o estímulo térmico (calor radiante) foi direcionado para a superfície plantar dos animais. Com uma resposta de retirada da pata, o estímulo foi automaticamente desligado e a latência para a resposta foi cronometrada. A intensidade da luz infravermelha foi ajustada para obtenção de valores basais de latência de aproximadamente 12 s. O tempo máximo para estimulação de 20 segundos foi usado para evitar lesão tecidual. A resposta basal de retirada da pata desses animais foi obtida uma hora antes da injeção de capsaicina. O extravasamento plasmático também foi medido no final de cada experimento. Nesse experimento, um minuto antes da injeção de capsaicina, os animais receberam injeção intraperitoneal de azul de Evans (10 mg/Kg). Trinta minutos após o estímulo, os animais foram sacrificados, a pata foi removida, pesada e incubada com formamida por 24 h, a 56 °C. A quantidade do azul de Evans extravasada foi medida por espectrofotômetro pela densidade óptica em 630 nm.

3.3.3. Hiperalgesia térmica e edema de pata induzido pelo adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial

Os animais tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial foram anestesiados com éter e em seguida receberam injeção intraplantar de 150 µl/pata de CFA (*Mycobacterium tuberculosis* 1 mg/ml, destruído por calor e suspenso em parafina) na pata direita. A hiperalgesia térmica foi medida 24 horas após a injeção de CFA e avaliada como descrito acima. A resposta basal de retirada da pata desses animais foi obtida uma hora antes da injeção de CFA. O edema de pata foi avaliado por pletismômetro (Ugo Basile, Itália) e expresso em mililitros como a diferença entre a pata direita e a pata esquerda, 24 horas após o tratamento com CFA.

3.3.4. Ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial

A união específica para a [³H]-resiniferatoxina foi realizada como descrito previamente por Szallasi *et al.* (1998). Para a obtenção das membranas, a medula espinhal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial foi removida e homogeneizada em tampão de homogeneização gelado (pH de 7,4) contendo: 5 mM de KCl; 5,8 mM de NaCl; 2 mM de MgCl₂; 0,75 mM de CaCl₂; 12 mM de glicose; 137 mM de sacarose e 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES). O homogenato foi primeiramente centrifugado

por 10 minutos, a 1.000 x g, a 4 °C. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 35,000 x g por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão de homogeneização e estocado a -70 °C, até o dia do experimento.

O experimento foi realizado em duplicata, com volume final de 500 µl, contendo tampão de homogeneização, com 0,25 mg/ml de soro albumina bovina (BSA), membrana (100 µg/proteína) e 50 pM de [³H]-resiniferatoxina. Para a medida da união inespecífica, 100 nM de resiniferatoxina não-radioativa foi incubado em alguns tubos. A reação da união específica foi iniciada com a transferência dos tubos para um banho com água a 37 °C. Após 60 minutos de incubação, a reação foi finalizada pela transferência dos tubos para um recipiente contendo gelo. Cem microgramas de glicoproteína ácida bovina α_1 foram adicionados em cada tubo para reduzir a união inespecífica. Finalmente, o radioligante ligado e livre foi separado por centrifugação por 15 minutos, a 20,000 X g, a 4 °C. A radioatividade foi medida no precipitado obtido por contagem em cintilador. A união específica foi calculada como a diferença da união específica total e inespecífica. A porcentagem da ligação específica nessas condições foi de aproximadamente 70 %. O experimento de união específica foi realizado em duplicata de 4 experimentos diferentes.

3.3.5. Análise do conteúdo protéico do receptor TRPV1 por imunodeteccção no gânglio da raiz dorsal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimantal

A técnica de *Western blot* foi realizada de acordo com o protocolo descrito previamente por Leal et al. (2002), com pequenas modificações. O GRD de ratos

tratados durante o período neonatal com capsaicina, poligodial, drimanial ou veículo foi removido e homogeneizado em tampão gelado contendo: 100 mM de Tris, 2 mM de EDTA, 200 mM de NaF e inibidores de protease (2 µg de aprotinina; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonila). A concentração de proteínas foi medida pelo *Kit* Biorad®, segundo as instruções do fabricante. As amostras de proteínas (50 µg) foram adicionadas em tampão contendo: 200 mM de Tris, 10 % de glicerol, 2 % de SDS, 2,75 mM de β-mercaptoetanol e 0,04 % de azul de bromofenol e, em seguida, foram fervidas durante 5 minutos. A proteína foi separada por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 10 % e eletrotransferida em membrana de nitrocelulose. Para evitar a ligação inespecífica do anticorpo, a membrana foi incubada primeiramente com leite desnatado diluído em TBS, por um período de 60 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada por duas horas com anticorpo policlonal anti-VR1 (1:500), em tampão contendo 10 mM de Tris; 0,15 mM de NaCl; 0,05 % de *Tween* (TBS-T); 0,02 % de azida e 2 % de BSA. Após o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em TBS-T por cinco minutos e incubada por uma hora com soro bovino anti-IgG de cabra, acoplado à fosfatase alcalina (1:1.000) em TBS-T, contendo 1 % de BSA. Após incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em TBS-T e duas vezes em TBS. A banda específica em aproximadamente 95 kD foi visualizada, pelo método colorimétrico, usando para isso 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e azul de nitro tetrazolium (NBT).

3.3.6. Ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos adultos não tratados no período neonatal

A união específica para a [³H]-resiniferatoxina foi realizado, como descrito no protocolo acima, utilizando membranas da medula espinhal de ratos adultos que não receberam tratamento neonatal. No entanto, para a obtenção da união específica de competição foram utilizadas diferentes concentrações (0,01-10 µM) de capsaicina, poligodial (0,1-10 µM) ou drimanial (0,1-10 µM), na presença ou ausência de 50 pM de [³H]-resiniferatoxina.

O experimento de união específica foi realizado em duplicatas de 4 experimentos diferentes.

3.3.7. Captação de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de ratos

Os experimentos foram realizados como descrito previamente por Honda *et al.*, (1989), com pequenas modificações. A medula espinhal de rato foi removida e homogeneizada em *potter* de vidro em 20 volumes de tampão A (pH 7,4), contendo 0,32 M de sacarose e 10 mM de Tris a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 1,000 x g por 15 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante resultante da primeira centrifugação foi novamente centrifugado a 18.000 xg por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão B (pH 7,4), contendo (em mM): 136 de NaCl; 1,3 de MgCl₂; 5 de KCl; 1,2 de CaCl₂; 10 de glicose; 20 de Tris, e centrifugado a 18,000 g por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em tampão B sem cálcio e usado para a realização do experimento.

Alíquotas de 250 µl de membrana foram adicionadas em tubos de polipropileno contendo tampão B sem cálcio e incubadas a 37 °C por 12 minutos. Após a pré-incubação, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,9 µCi) foi adicionado em cada tubo simultaneamente com KCl (77 mM), capsaicina (1 µM), poligodial (5 µM) e drimanial (5 µM) que foram incubados por um minuto, a 37 °C. Imediatamente após a incubação, 500 µl de tampão contendo EGTA (136 mM de NaCl; 1,3 mM de MgCl_2 ; 5 mM de KCl; 1,2 mM de CaCl_2 ; 10 mM de glicose, 20 mM de Tris e 30 mM de EGTA; pH de 7,4) foram adicionados em cada tubo e o experimento foi finalizado filtrando-se as amostras três vezes em filtro GF/B pré-lavado, com tampão contendo EGTA. Os filtros foram secos e a radioatividade foi medida por cintilação líquida. A captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após estimulação com KCl, capsaicina, poligodial e drimanial foi calculada como a porcentagem dos valores obtidos para a captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (sem nenhum estímulo). O experimento de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi realizado em duplicata de 3 experimentos diferentes.

3.3.8. Medida do aumento de cálcio intracelular em cultura de neurônios do gânglio do nervo trigêmeo de rato e em células HEK293 transfectadas com o TRPV1 humano (hTRPV1)

Ratos Sprague-Dawley neonatos (dois a três dias de vida) foram anestesiados e decapitados. Os gânglios do nervo trigêmeo foram removidos e rapidamente colocados em placa de Petri contendo PBS gelado. Após a remoção dos tecidos conectivos, os gânglios foram colocados em PBS sem Ca^{2+} . Em seguida, foram transferidos para a proveta contendo colagenase (1 mg/ml dissolvido em PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+}) por um período de 35 minutos, a 37 °C. Após esse

período, os gânglios foram lavados três vezes com PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} e colocados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) gelado contendo 10 % de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina. Os gânglios foram então dissociados com o auxílio de seringas com agulhas de 23 a 25G e filtrados em filtro de 40 μm para a remoção dos resíduos, colocados em 8 ml de DMEM e centrifugado a 200 x g por cinco minutos. O precipitado resultante foi ressuspenso em DMEM suplementado com 100 ng/ml de fator de crescimento do nervo de camundongo (NGF-7S) e 2,5 μM de citosina-b-D-arabino-furanosídeo (ARA-C) para impedir o crescimento de células não neuronais. As células foram então colocadas em placas de Petri tratadas com poli-L-lisina (8,3 μl) e laminina (5 μl) e permaneceram por dois dias em incubadora com 5 % de CO_2 e ar. Em outra série de experimentos, foram utilizadas células embrionárias de rim humano transfectadas com o TRPV1 humano (HEK293 hTRPV1). A clonagem e a expressão foram realizadas como descrito previamente por Hayes *et al.* (2000). Tanto as células do gânglio do nervo trigêmio, quanto as células HEK293 hTRPV1 foram usadas dois dias após serem plaqueadas. No dia do experimento, ambas células foram incubadas por um período de 35 minutos com Fura-2-AM-éster (3 μM) em tampão A contendo: 1,4 mM de CaCl_2 ; 5,4 mM de KCl; 0,4 mM de MgSO_4 ; 135 mM de NaCl; 5 mM de D-glicose; 10 mM de HEPES, com BSA 0,1 % a 37 °C. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão A e transferidas para uma câmara, que foi acoplada ao microscópio Nikon eclipse TE300. As células marcadas com fura-2-AM-éster foram selecionadas e estimuladas em 340 e 380 nm para indicar mudanças relativas na concentração de cálcio intracelular em uma proporção de F340/F380 registradas por um sistema de análise de imagem dinâmica (Laboratory Automation 2.0, RCS, Ferrara-Itália).

Após o período de incubação com Fura-2-AM-éster, as células HEK293 hTRPV1 foram expostas ao poligodial (10 μ M) ou ao drimantal (10 μ M). Em outra série de experimentos, células do gânglio do nervo trigêmeo foram expostas ao poligodial (30 μ M) ou drimantal (100 μ M). Células HEK293 hTRPV1 ou selvagem (wild type-WT) também foram expostas a alta concentração de poligodial ou drimantal (100 μ M). Foram realizados experimentos controle, utilizando somente o veículo ou a capsaicina (1 μ M em células do gânglio do nervo trigêmeo ou 10 nM em células HEK293 hTRPV1). A ionomicina (5 μ M) foi adicionada à câmara ao final de cada experimento e a variação na concentração de cálcio intracelular foi expressa como o aumento dos valores basais. A curva de calibração, a partir de um tampão contendo Fura-2-AM-éster e a concentração determinante de cálcio (KUDO *et al.*, 1986), foi usada para converter o dado obtido da proporção de F340/F380 para a concentração de cálcio intracelular (nM).

3.3.9. Bexiga isolada de rato

Ratos Wistar (no experimento em que foi utilizado o antagonista vermelho de rutênio) e ratos Sprague-Dawley (nos demais experimentos) machos, pesando 220-300 g foram sacrificados por deslocamento cervical e exsangüinados. A bexiga urinária foi rapidamente removida e colocada em placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs (composição mM: NaCl 119,0; KCl 4,7; MgSO₄ 1,5; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0; KHPO₄ 1,2 e glicose 11,0; pH 7,2). A bexiga urinária foi dividida em duas partes de aproximadamente 4-5 mm e foi limpa do tecido conectivo e gorduras aderentes. Em seguida, as preparações foram transferidas para um banho de 5 ml de solução de Krebs e foram mantidos a 37 °C, aeradas com 95 % O₂ e 5 % CO₂.

Mudanças na tensão isotônica foram registradas em polígrafo acoplado a um computador. A preparação foi submetida a uma tensão basal de 1 g, seguido por um período de equilíbrio de 1 h. Durante este período a solução de Krebs foi renovada a cada 15 minutos

Após o período de equilíbrio, a bexiga isolada de rato foi contraída pela adição de uma concentração sub-máxima de carbacol (0,3 μM), sendo que esta contração foi considerada como 100 %. Em seguida, a solução de Krebs foi renovada a cada 15 minutos seguido por um período de equilíbrio de 40 minutos. Passado este período, foi realizado curva cumulativa concentração-resposta de contração para o poligodial ou drimaniol (0,001 – 100 μM). Cada concentração da droga foi adicionada ao banho, quando o platô de efeito máximo da concentração anterior estava estabelecido.

Para analisar o mecanismo pelo qual o poligodial e o drimaniol produzem contração na bexiga isolada de ratas, curvas cumulativas concentração-resposta para o poligodial ou para o drimaniol foram realizadas na ausência ou na presença de SR140333 e SR 48968 1 μM (antagonistas dos receptores NK_1 e NK_2 , respectivamente), vermelho de rutênio 30 μM (antagonista não seletivo do TRPV1), capsazepina 10 μM , ou iodo-reseniferatoxina 10 nM (antagonistas seletivos do TRPV1). Todos os antagonistas permaneceram em contato com o tecido por 15 minutos, antes de iniciar a curva com o poligodial ou drimaniol. Para evitar a dessensibilização da preparação, somente uma curva cumulativa concentração-resposta de contração foi obtida para o poligodial ou drimaniol na ausência ou na presença dos antagonistas. Experimentos controles foram realizados simultaneamente em banhos adjacentes.

Em outro grupo experimental, foi avaliada a capacidade do poligodial ou do drimanial causar dessensibilização cruzada com a capsaicina. Neste experimento, a preparação foi incubada por 15 minutos com uma única concentração de capsaicina (1 μM). Após o período de incubação, foi construída curva concentração-resposta de contração para o poligodial ou para o drimanial. Em outra série de experimentos, poligodial ou drimanial (10 μM) foram incubados e 15 minutos após foi realizada curva concentração-resposta de contração para a capsaicina.

3.4. DROGAS

Foram usadas as seguintes drogas: adjuvante completo de Freund (CFA; H37Ra, ATCC, 25177), capsaicina, formalina, vermelho de rutênio, carbacol, albumina sérica bovina (BSA), azul de Evans e α_1 glicoproteína ácida bovina, todas da Sigma (St. Louis, EUA.); SR140333 e SR 48968 foram gentilmente doadas pelo Dr. Xavier Emonds-Alt, Sanofi-Synthlabo', Montpellier, França. Iodo-resiniferatoxina (Tocris, U.K.); ^3H -resiniferatoxina (37 Ci/mmol¹), da Perkin Elmer Life Sciences (Washington, EUA); anticorpo anti-TRPV1 policlonal e soro bovino anti-IgG de cabra (Santa Cruz, EUA); $^{45}\text{Ca}^{2+}$, membrana de nitrocelulose, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, BCIP e NBT, todas da Amersham Pharmacia Biotech (UK); ionomicina, laminina, poli-L-lisina (Tocris, U.K); NGF-7S murino e colagenase/dispase (Roche Diagnostics, Itália); meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro bovino fetal (FBS) inativado por calor, L-glutamina, penicilina e estreptomicina (10,000 IU/ml-10,000 UG/ml), da Gibco (Itália); Fura-2-AM-éster (Società Italiana Chimici, Itália).

Capsaicina, capsazepina, poligodial e drimanial foram diluídos inicialmente

em 100 % de etanol. Fura-2-AM foi diluído igualmente em 100 % de DMSO. Todas as soluções estoques foram armazenadas a 4 °C e diluído em solução de Krebs ou tampão referente a cada experimento, imediatamente antes do uso. As concentrações finais de etanol ou de dimetil sulfóxido (DMSO) não excederam a 0,1 % e não tiveram qualquer efeito *per se*. Para cada grupo experimental, foram realizados experimentos controles paralelos na presença do veículo usado para diluir cada droga.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os experimentos *in vivo*, os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 6-9 animais por grupo. A captação de cálcio para KCl, capsaicina, poligodial e drimanial foi calculada como a porcentagem dos valores obtidos para a captação basal de cálcio (sem nenhum estímulo).

A concentração do aumento de cálcio intracelular foi calculada a partir do programa Origin Software, Microcal Software (Northampton, MA, EUA). As comparações estatísticas dos dados foram realizadas pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman Keuls ou Dunnett. Para as preparações de órgão isolado, a curva cumulativa concentração-resposta de contração foi expressa como porcentagem (%) de resposta ao carbacol e a porcentagem de inibição foi obtida para cada experimento individual em relação ao valor do controle. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student. A concentração dos compostos que produziram 50 % do efeito máximo (CE₅₀ ou CI₅₀) foram determinados pelo programa GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A). Em todos os experimentos, valores de *P* menores que 0,05 foram

considerados estadísticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial na nocicepção induzida pela formalina

A Figura 4A demonstra que o tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial causou inibição significativa da primeira fase da nocicepção induzida pela formalina (porcentagem de inibição: $60 \pm 5 \%$; $55 \pm 6 \%$ e $61 \pm 3 \%$, respectivamente) em ratos, seis semanas após o tratamento com as drogas. Além disso, a segunda fase (Figura 4B) da nocicepção induzida pela formalina foi parcialmente, mas significativamente, inibida pelos mesmos tratamentos neonatais com capsaicina, poligodial ou drimanial (porcentagem de inibição: $22 \pm 6 \%$; $21 \pm 6 \%$ e $27 \pm 12 \%$, respectivamente).

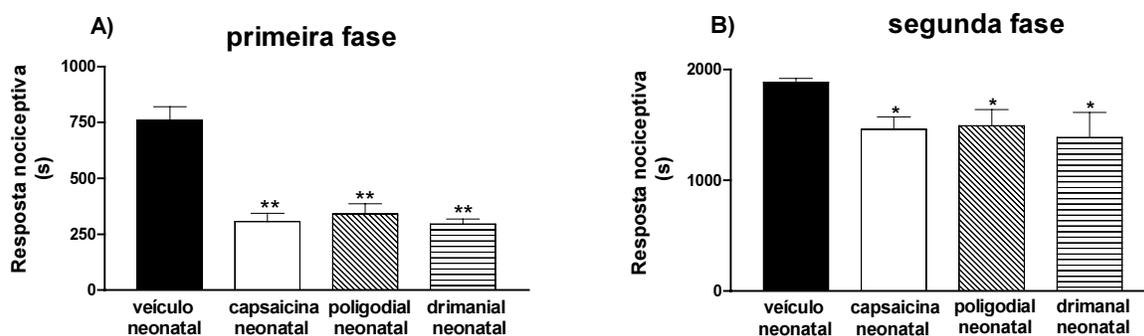


Figura 4. Influência do tratamento neonatal de ratos com veículo (1 ml/kg), capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimanial (150 mg/kg), na primeira fase (0 - 5 minutos) (A) e na segunda fase (20 - 50 minutos) (B) da nocicepção induzida pela formalina. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de quatro animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ difere significativamente dos animais tratados no período neonatal com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

4.2. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimantal na hiperalgisia térmica e no extravasamento plasmático induzido pela capsaicina

O tratamento neonatal dos ratos com capsaicina ou com os compostos poligodial ou drimantal não alterou significativamente a latência basal dos animais à estimulação térmica quando comparados com os animais que receberam veículo no período neonatal (Figura 5A).

A injeção intraplantar de capsaicina (20 nmol/pata) nos ratos tratados no período neonatal com o veículo causou marcada resposta hiperalgésica, em comparação com os animais que receberam PBS na pata (Figura 5B). Essas respostas foram observadas por meio de uma significativa redução na latência de retirada da pata após estimulação térmica. O tratamento de animais no período neonatal com capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimantal (150 mg/kg) aboliu a resposta hiperalgésica induzida pela administração de capsaicina (20 nmol/pata) na pata (Figura 5B). Além disso, o tratamento neonatal de ratos com capsaicina, poligodial ou drimantal causou redução significativa ($55 \pm 12 \%$, $57 \pm 8 \%$, $58 \pm 7 \%$, respectivamente) no extravasamento plasmático induzido pela injeção intraplantar de capsaicina (20 nmol/pata) (Figura 5C).

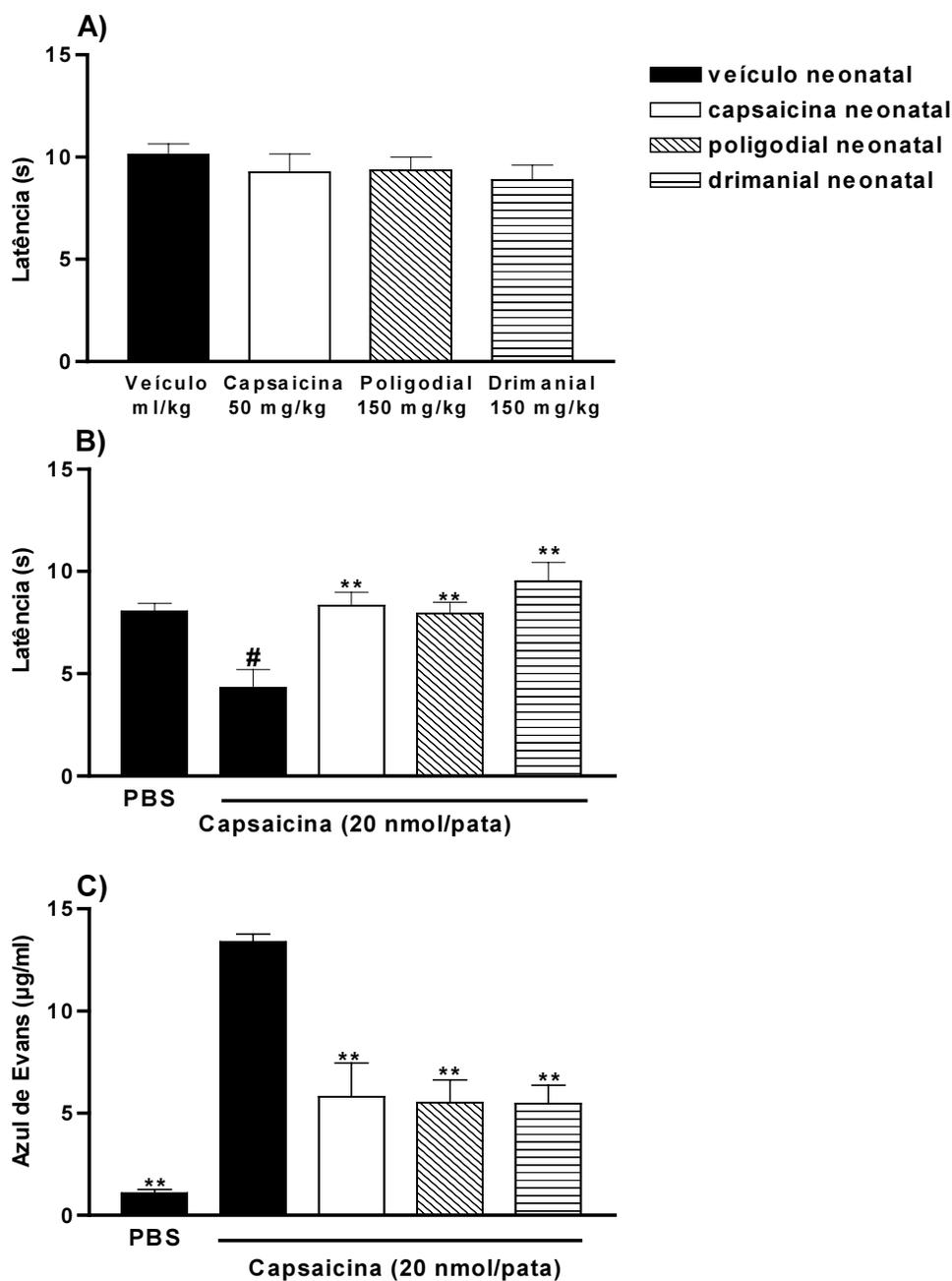


Figura 5. Resposta basal á estimulação térmica (A). Hiperálgia térmica (B) e extravasamento plasmático (C) induzido pela injeção intraplantar de capsaicina (20 nmol/pata) em ratos tratados no período neonatal com veículo (1 ml/kg), capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimanial (150 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 4-6 animais. $**P < 0,01$ difere significativamente dos animais tratados no período neonatal com veículo e que receberam capsaicina na pata. $\#P < 0,05$ comparado com os animais tratados no período neonatal com veículo e que receberam PBS na pata (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman Keuls).

4.3. Efeito do tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial na hiperalgesia térmica e no edema de pata induzido pelo CFA

O tratamento neonatal dos ratos com capsaicina ou com os compostos poligodial ou drimanial não alterou significativamente a latência basal dos animais à estimulação térmica quando comparados com os animais que receberam veículo no período neonatal (Figura 6A).

O tratamento neonatal dos ratos com capsaicina, poligodial ou drimanial resultou em redução significativa da resposta hiperalgésica induzida pelo CFA ($63 \pm 5 \%$; $27 \pm 3 \%$; $71 \pm 7 \%$, respectivamente) (Figura 6B). No entanto, o tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial não foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema de pata induzido pelo CFA (Figura 6C).

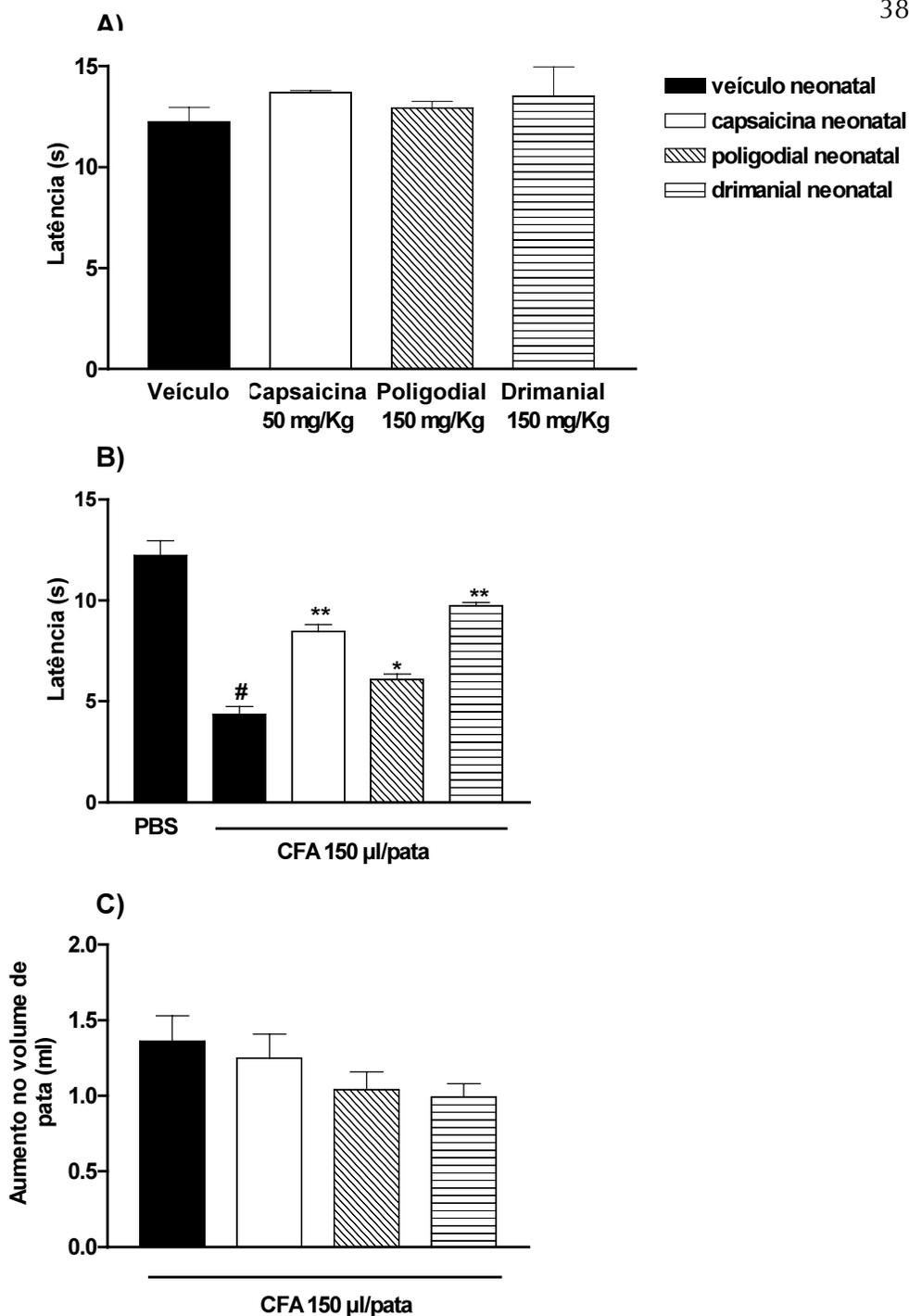
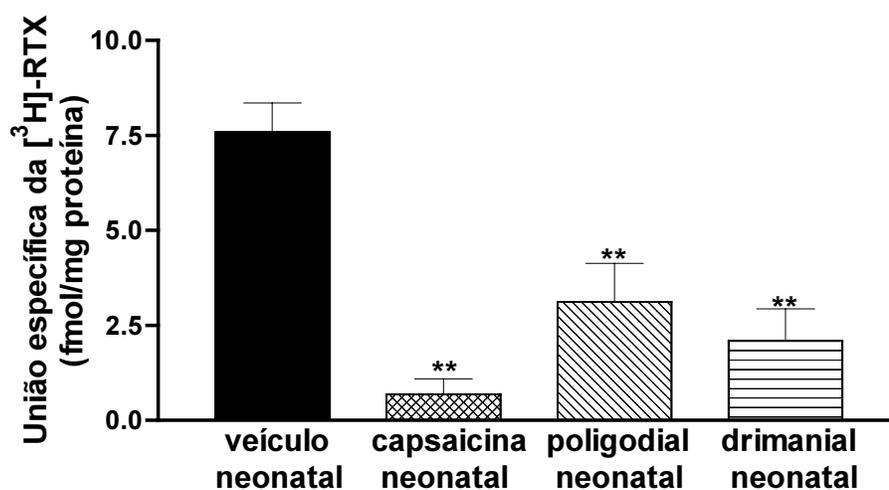


Figura 6. Resposta basal à estimulação térmica (A). Hiperálgia térmica (B) e edema de pata (C) induzido pela injeção intraplantar de CFA em ratos tratados no período neonatal com veículo (1 ml/kg), capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimanial (150 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de seis animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ difere significativamente dos animais tratados no período neonatal com veículo e que receberam CFA na pata. # $P < 0,05$ comparado com os animais tratados no período neonatal com veículo e que receberam PBS na pata (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman Keuls).

4.4. Ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial

A Figura 7 demonstra que o tratamento no período neonatal de ratos com capsaicina praticamente aboliu a união específica para a [³H]-resiniferatoxina ($90 \pm 5 \%$) em preparações de membrana da medula espinhal de ratos. Da mesma forma, o tratamento neonatal com poligodial ou com o drimanial causou redução significativa ($59 \pm 13 \%$ e $72 \pm 11 \%$, respectivamente) nos sítios de ligação ou na afinidade para [³H]-resiniferatoxina (Figura 7).



-Figura 7. Influência do tratamento neonatal com o veículo (1 ml/kg), capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimanial (150 mg/kg) na densidade de sítios de ligação específica para a [³H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em duplicata. ** $P < 0,01$ difere significativamente dos animais tratados no período neonatal com veículo (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett).

4.5. Análise da presença do receptor TRPV1 no gânglio da raiz dorsal de ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodol ou drimanial pela técnica de *Western blot*

Como grande parte do TRPV1 expresso na medula espinhal é originário das terminações espinhal das fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, foi investigado, em animais tratados no período neonatal com a capsaicina, o poligodol ou drimanial, a expressão da proteína do TRPV1 nos corpos celulares dos neurônios que formam estas fibras (GRD). As Figuras 8A e a 8B demonstram altos níveis de TRPV1 no GRD de ratos tratados no período neonatal com o veículo. O tratamento neonatal dos ratos com capsaicina resultou em grande diminuição na expressão da proteína TRPV1 no GRD ($91 \pm 4 \%$). No entanto, o tratamento neonatal de ratos com drimanial não foi capaz de alterar significativamente a expressão do TRPV1. Ao contrário, o tratamento neonatal de ratos com poligodol causou significativo aumento ($38 \pm 8 \%$) na expressão da proteína TRPV1 (Figura 8 A, B).

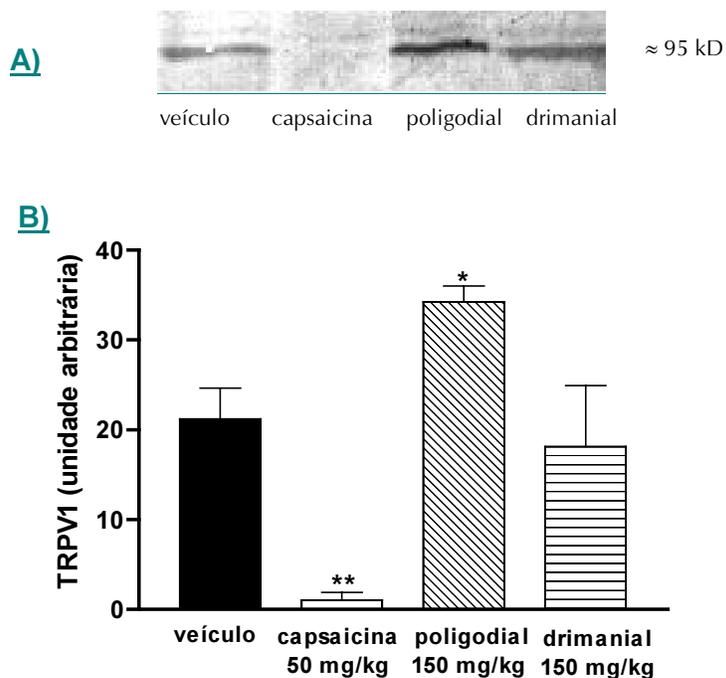


Figura 8. (A) Figura representativa da imunodeteção dos níveis da proteína TRPV1 em ratos tratados no período neonatal com veículo (1 ml/kg), capsaicina (50 mg/kg), poligodial (150 mg/kg) ou drimanial (150 mg/kg). (B) Quantificação da proteína TRPV1 no GRD de ratos tratados no período neonatal com veículo, capsaicina, poligodial ou drimanial. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de quatro experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ difere significativamente dos animais tratados no período neonatal com veículo (ANOVA de uma via seguida, pelo teste de Dunnett).

4.6. Efeito do poligodial e drimanial no ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina em membranas da medula espinhal de ratos

Como em animais tratados no período neonatal com o poligodial ou drimanial ocorreu redução significativa na expressão do sítio de ligação da [³H]-resiniferatoxina, avaliou-se também a capacidade desses dois sesquiterpenos em deslocar diretamente a união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de rato. A Figura 9 demonstra que tanto o poligodial quanto o drimanial (0,1 - 10 μ M) deslocaram a união específica para a [³H]-resiniferatoxina, apresentando inibição de 71 ± 18 % e 86 ± 4 %, respectivamente, na medula espinhal de ratos. O mesmo efeito foi observado com a capsaicina (0,1 - 10 μ M), que também causou significativo deslocamento com inibição de 94 ± 3 % na concentração de 10 μ M, no sítio de ligação da [³H]-resiniferatoxina (Figura 9). As CI_{50s} obtidas para o poligodial, drimanial e a capsaicina foram de 4,2 (0,3 - 10 μ M), 3,2 (0,1 - 15 μ M) e 0,48 (0,08 - 19 μ M), respectivamente.

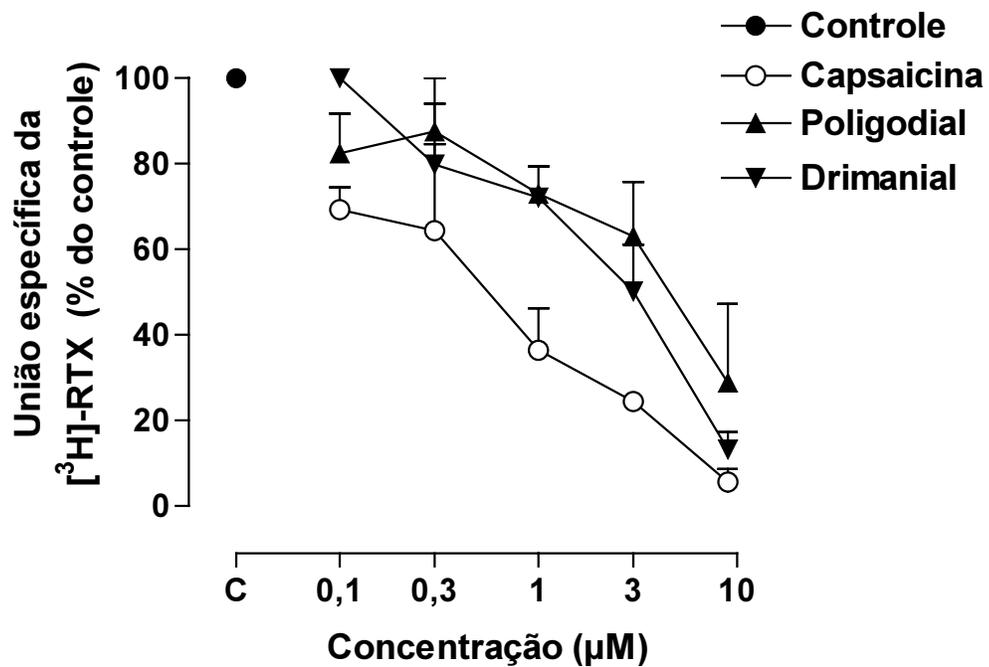


Figura 9. Ensaio de competição para a união específica da $[^3\text{H}]$ -resiniferatoxina na medula espinhal de ratos induzidos pela capsaicina, poligodial ou drimanial. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em duplicata.

4.7. Efeito do poligodial e do drimanial na captação de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de rato

Dados descritos na literatura têm demonstrado que a capsaicina e agonistas vanilóides promovem captação de cálcio no GRD de ratos (ÁCS *et al.*, 1996). Dessa maneira, foi avaliado se os sesquiterpenos poligodial e drimanial poderiam causar captação de cálcio semelhante à capsaicina. O poligodial e o drimanial (5 μ M) induziram influxo de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de rato de 70 ± 15 % e 47 ± 16 %, respectivamente, em relação ao influxo de cálcio induzido pelo KCl. Como esperado, a capsaicina também promoveu influxo de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de rato de 63 ± 10 % quando comparado com o valor obtido para o KCl (Figura 10).

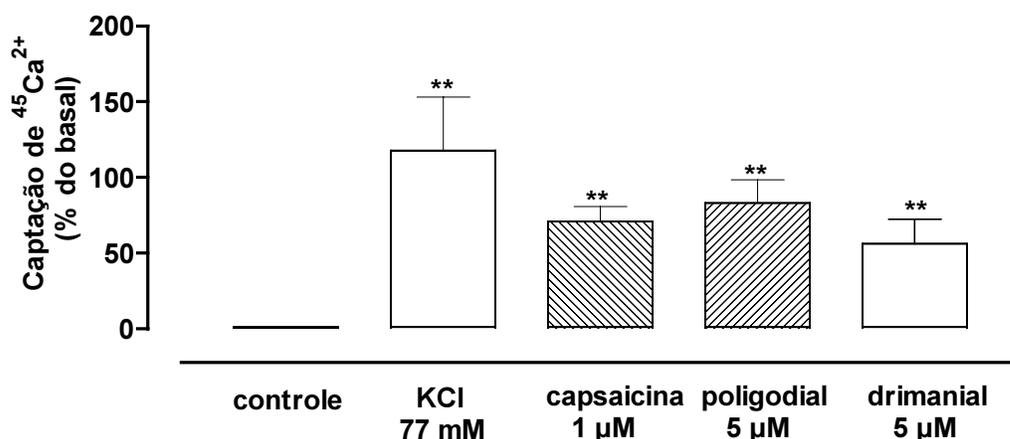


Figura 10. Efeito do KCl (77 mM), da capsaicina (1 μ M), do poligodial (5 μ M) ou drimanial (5 μ M) na captação de cálcio em fração vesicular na medula espinhal de rato. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em duplicata. ** $P < 0,01$ difere significativamente do valor da captação de cálcio basal (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

4.8. Efeito do poligodial e do drimanial no aumento de cálcio intracelular em culturas de neurônio do gânglio trigêmio de rato

Os resultados da Figura 11 e 12 demonstram que, em sistema nativo, o poligodial na concentração de 30 μM e o drimanial na concentração de 100 μM causaram aumento de cálcio intracelular. No entanto, nas mesmas condições, tanto o poligodial quanto o drimanial foram menos potentes que a capsaicina (1 μM). Os valores calculados para o aumento de cálcio intracelular quando comparado com a ionomicina (5 μM) foram de $30 \pm 5 \%$, $27 \pm 4 \%$ e $55 \pm 9 \%$, respectivamente para poligodial, drimanial e a capsaicina.

Para analisar se ambos sesquiterpenos poderiam estar atuando como antagonista do TRPV1, a capsaicina (1 μM) foi adicionada no final de cada experimento. As Figuras 11 e 12, demonstram que tanto o poligodial quanto o drimanial não alteraram o aumento de cálcio intracelular induzido pela capsaicina.

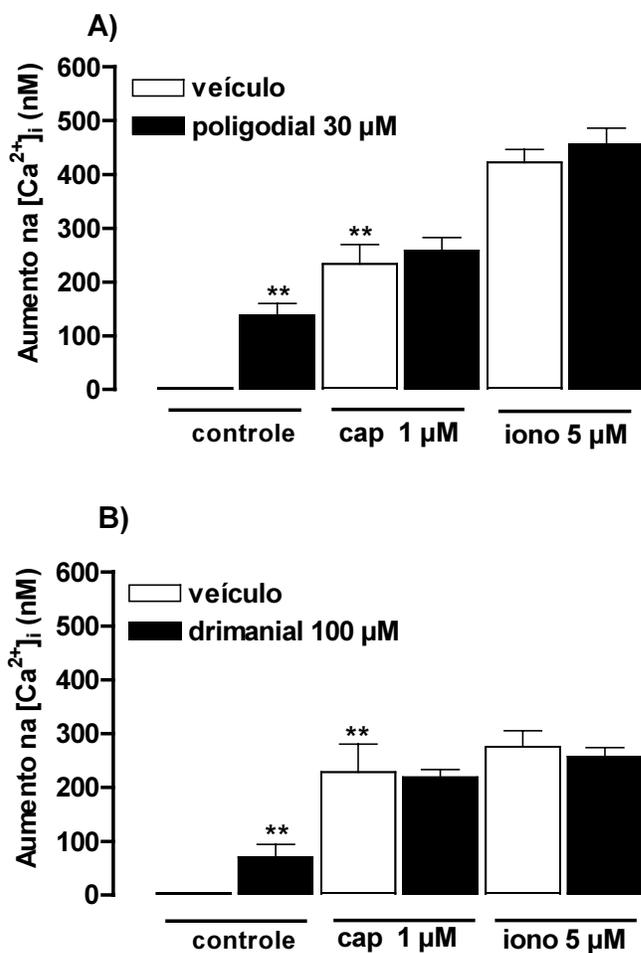


Figura 11. Efeito do poligodial 30 μ M (A) e do drimaniol 100 μ M (B) no aumento de cálcio intracelular em células do gânglio do nervo trigêmio de ratos. Capsaicina e ionomicina foram adicionadas no final de cada experimento. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de três experimentos com um total de 20 células. ** $P < 0,01$ difere significativamente quando comparado com o valor obtido para o veículo. (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman Keuls). Cap (capsaicina) e Iono (ionomicina).

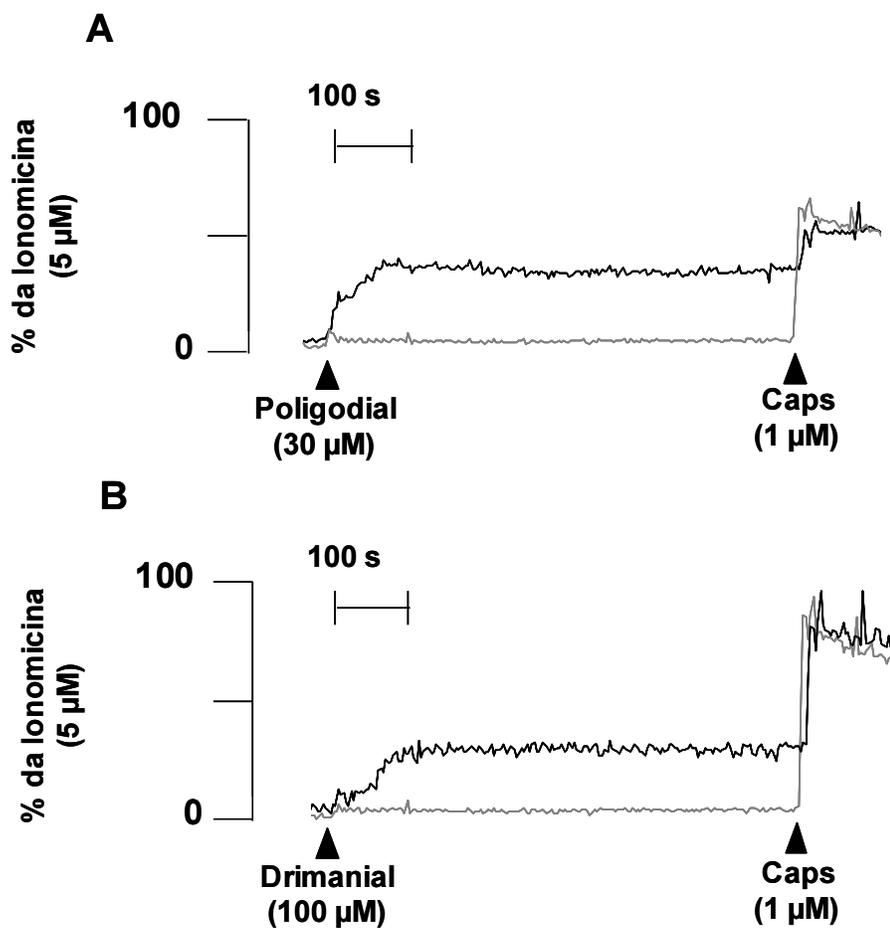


Figura 12. Traçado típico da mobilização de cálcio intracelular induzido pelo poligodial (30 μM , painel A, linhas grossas) e drimanial (100 μM , painel B, linhas grossas) em cultura de neurônios do gânglio do nervo trigêmeo quando comparado com o veículo (linhas finas). O efeito da capsaicina (caps, 1 μM) também foi avaliado. O Poligodial e o drimanial foram efetivos em todos os neurônios sensíveis a capsaicina testados.

4.9. Efeito do poligodial e do drimanial no aumento de cálcio intracelular em células HEK293 transfetadas com hTRPV1

Para verificar se o aumento de cálcio intracelular causado pelo poligodial e pelo drimanial em cultura de gânglio do nervo trigêmio de ratos era devido a uma ação direta no TRPV1, foram utilizadas células HEK293 expressando o hTRPV1. Nesse experimento, observou-se que tanto o poligodial quanto o drimanial na concentração de até 10 μM não foram capazes de causar aumento de cálcio intracelular (Figura 13A e B). Concentrações maiores que 100 μM para o poligodial e drimanial não puderam ser testadas porque causavam destruição da membrana celular tanto em células HEK293 transfetadas com o hTRPV1 quanto em WT (dados não mostrados). Para analisar se ambos sesquiterpenos poderiam estar atuando como antagonistas do TRPV1, a capsaicina (10 nM) foi adicionada no final de cada experimento. As figuras 13A e B m que tanto o poligodial quanto o drimanial não alteraram o aumento de cálcio intracelular induzido pela capsacina. A capsaicina em células HEK293 hTRPV1 foi eficaz em concentrações menores (10 nM) quando comparada com o aumento intracelular observado em cultura de neurônio do gânglio trigêmio (capsaicina, 1 μM).

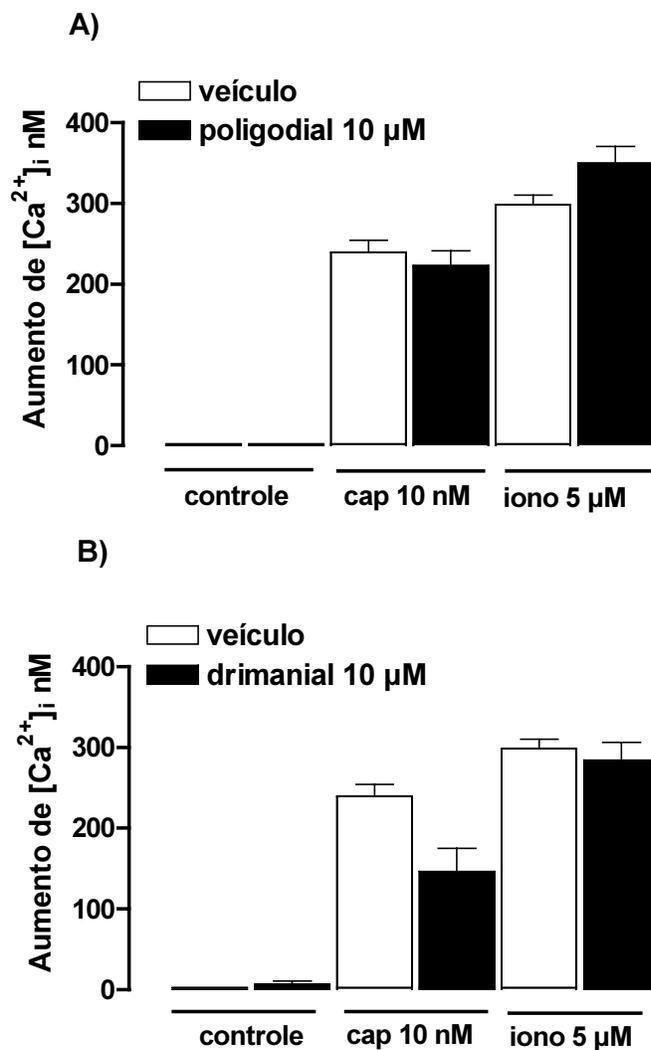


Figura 13. Efeito do poligodial (10 μM) e do drimanial (10 μM) sobre o aumento de cálcio intracelular em células HEK293 transfectadas com o hTRPV1. Capsaicina e ionomicina foram adicionadas no final do experimento. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de três experimentos com um total de 32 células. Iono (ionomicina) e cap (capsaicina).

4.10. Efeito do SR 140333, SR 48968, capsazepina e a iodo-resiniferatoxina na contração induzida pelo poligodial e o drimantal na bexiga urinária de rato

As Figuras 14 e 15 , demonstram que tanto o poligodial quanto o drimantal causaram contração dependente da concentração na bexiga isolada de rato, com CE_{50s} de 1,5 (0,004 - 2 μ M) e 2,8 (0,005 - 17 μ M), respectivamente. Para avaliar se esse efeito contrátil era mediado pela liberação de neuropeptídeos, foram utilizados antagonistas dos receptores NK_1 e NK_2 (SR 140333 e SR48968, respectivamente). As figuras 14A e 15A demonstram que essa contração foi inibida ($66 \pm 9 \%$ e $58 \pm 7 \%$ para o poligodial e drimantal, respectivamente) pela associação dos antagonistas do receptor NK_1 e NK_2 (Figura 14A e 15A). Por outro lado, a capsazepina e a iodo-resiniferatoxina promoveram inibição parcial, porém significativa, da contração induzida pelo poligodial (Figura 14B). No entanto, ambos antagonistas do TRPV1 não promoveram inibição significativa sobre a contração induzida pelo drimantal (Figura 15B). A capsaicina , mas não o poligodial nem o drimantal causaram marcada taquifilaxia nas respostas contráteis. Além disso, o poligodial e o drimantal induziram resposta contrátil ,mas não causaram dessensibilização cruzada com a capsaicina (resultados não mostrados).

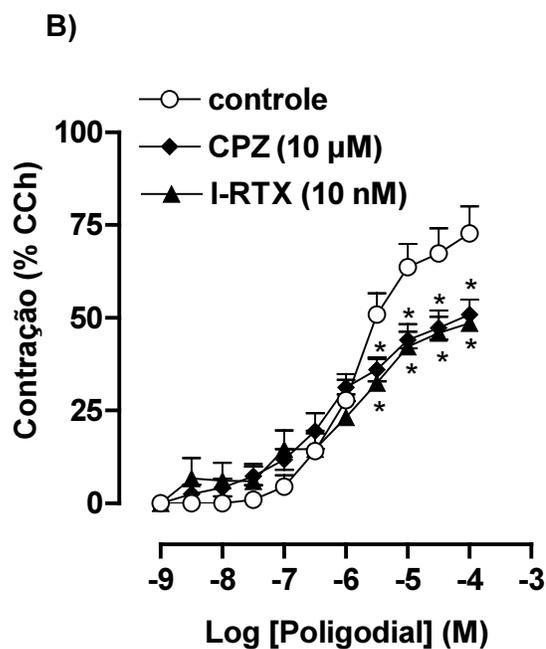
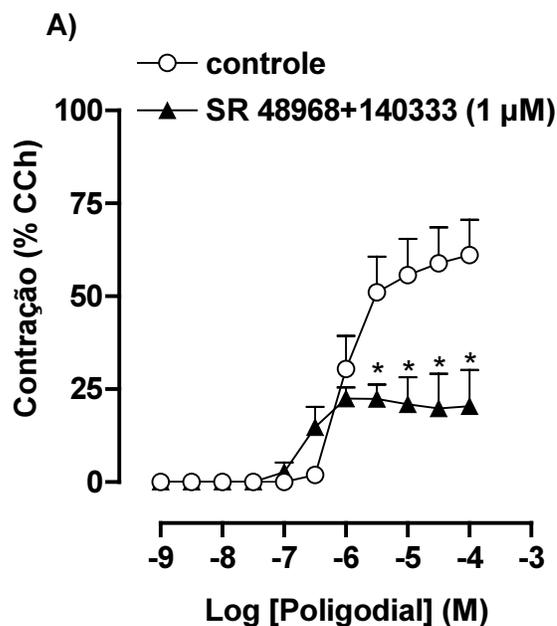


Figura 14. Influência de antagonistas de receptores (A) NK_1 (SR140333 - 1 μ M) e NK_2 (SR48968 1 μ M) ou dos antagonistas do receptor (B) TRPV1, a capsazepina (10 μ M) e a iodo-resiniferatoxina (1 nM) sobre os efeitos contráteis do poligodial (0,001-100 μ M) em bexiga isolada de rato. Cada ponto representa a média de 10 experimentos e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $P < 0,05$; difere significativamente do controle (teste t de Student).

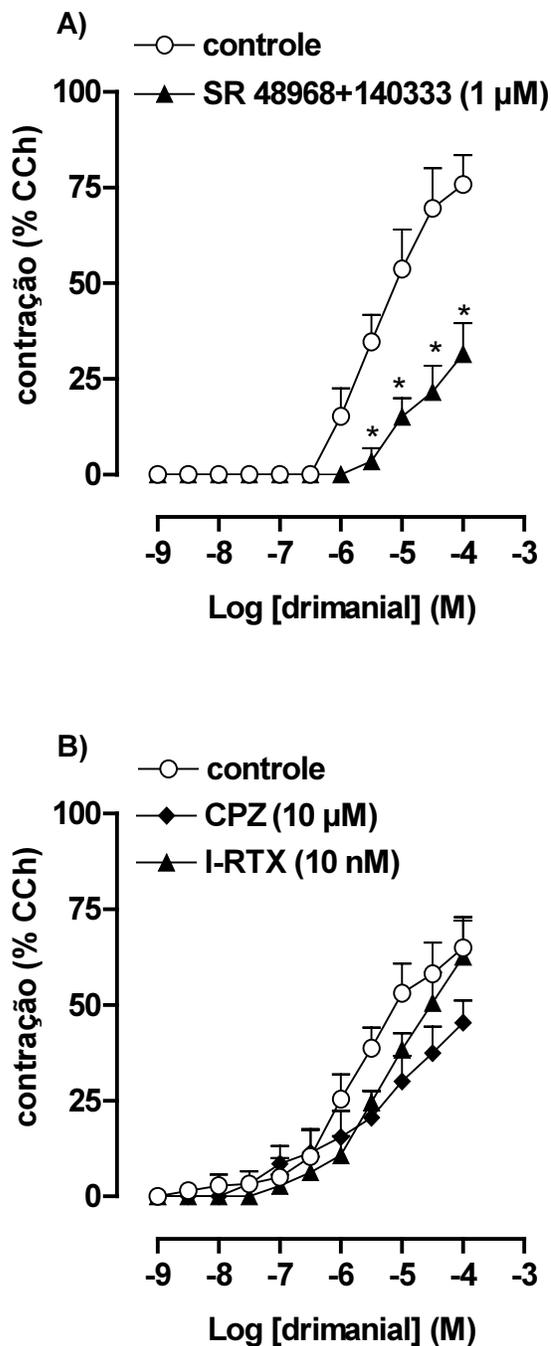


Figura 15. Influência de antagonistas de receptores (A) NK_1 (SR140333 - 1 μ M) e NK_2 (SR48968 1 μ M) ou dos antagonistas do receptor (B) TRPV1, a capsazepina (10 μ M) e a iodo-resiniferatoxina (1 nM) sobre os efeitos contráteis do drimaniol (0,001-100 μ M) em bexiga isolada de rato. Cada ponto representa a média de 9 experimentos e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $P < 0,05$; difere significativamente do controle (teste t de Student).

4.11. Efeito do vermelho de rutênio sobre a contração induzida pelo poligodial e pelo drimanial na bexiga urinária de rato.

A Figura 16A e B, demonstram que a curva cumulativa concentração-resposta da contração induzida pelo poligodial (0,001 - 100 μ M) ou drimanial (0,001 - 100 μ M) na bexiga isolada de rato, foi inibida de maneira significativa pelo vermelho de rutênio (30 μ M), com inibição de $43 \pm 7 \%$ e $43 \pm 5 \%$, respectivamente. A diferença observada nas respostas entre as figuras 14 e 15 e a figura 16, para a curva cumulativa concentração-resposta de contração, obtida para o poligodial e drimanial, podem estar relacionadas com as diferentes espécies de ratos utilizados durante o desenvolvimento deste projeto. Os resultados obtidos na figura 14 e 15 foram realizados em ratos Sprague-Dawley e o da figura 16 foram realizados em ratos Wistar.

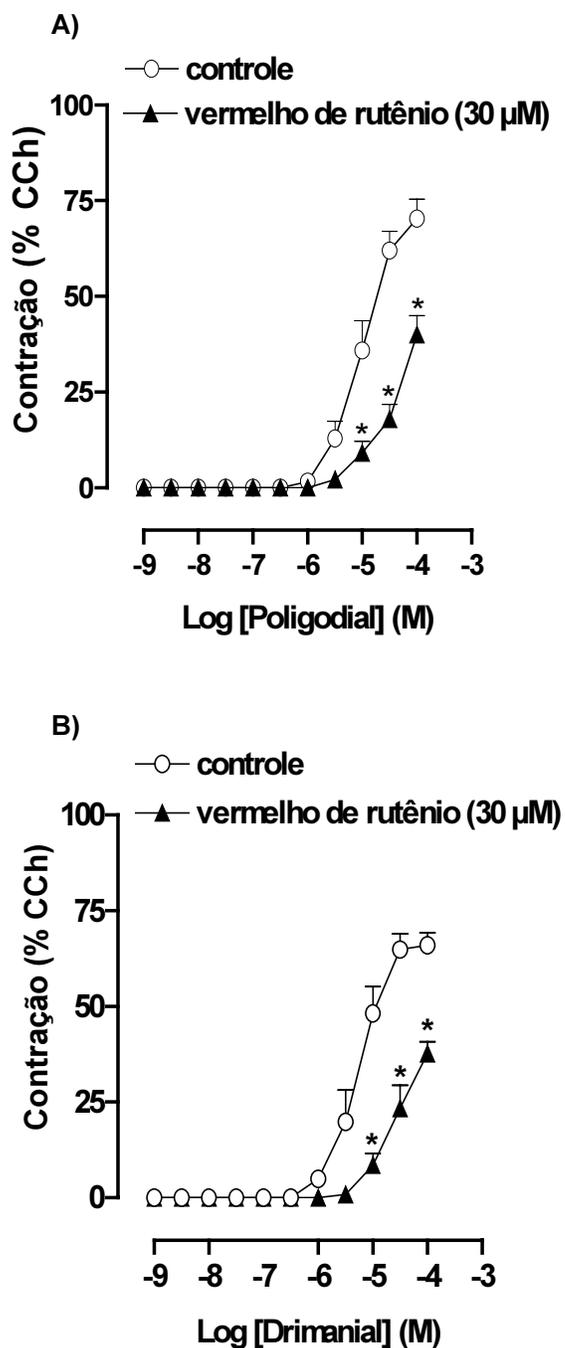


Figura 16. Influência do antagonista não seletivo para o TRPV1, o vermelho de rutênio (30 μ M) sobre os efeitos contráteis do (A) poligodial (0,001-100 μ M) ou do (B) drimanial (0,001-100 μ M) em bexiga isolada de rato. Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $P < 0,05$; difere significativamente do controle (teste t de Student).

5. DISCUSSÃO

Vários produtos naturais têm sido de grande importância tanto na descoberta como no entendimento do funcionamento de numerosos receptores e mecanismos de transdução de sinais intracelulares. Muitas substâncias naturais, biologicamente ativas, foram descobertas por meio de estudos de interação droga-receptor e atualmente, constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Dentro deste contexto, a existência do TRPV1 foi postulada com base na seletividade que a capsaicina apresentava para os neurônios sensoriais primários (JANCSÓ, 1968; SZOLCSÁNYI e JANCSÓ-GABOR, 1975).

Atualmente, o fenômeno de dessensibilização e neurotoxicidade seletiva apresentada pela capsaicina é de grande interesse na clínica para o desenvolvimento de novas substâncias com potencial analgésico. A dessensibilização do TRPV1 induzida pela capsaicina ainda não é bem compreendida. No entanto, esse processo parece ser, em parte, dependente de cálcio, e pode ser aumentado pela desfosforilação do receptor, por meio da ação da enzima calcineurina dependente da calmodulina (DOCHERTY *et al.*, 1996). Além disso, outros processos como depleção de neuropeptídeos, incluindo substância P e CGRP das vesículas neuronais (YAKSH *et al.*, 1979) e o bloqueio não específico do canal de cálcio dependente de voltagem (PETERSEN *et al.*, 1987; DOCHERTY *et al.*, 1991), contribuem para a dessensibilização funcional do TRPV1 tanto nos estudos realizados *in vivo* como nos *in vitro*. O fato de que, durante esse período de dessensibilização, tanto humanos quanto os animais são relativamente resistentes à estimulação com capsaicina ou a outros estímulos dolorosos, tem justificado seu uso

na clínica para o tratamento de algumas patologias como a hiper-reflexia ou hipersensibilidade da bexiga urinária, estados de dor neuropática, como neuralgia pós-herpética, dor neuropática causada pela diabetes, síndrome da dor pós-mastectomia, osteoartrite e artrite reumatóide (SZALLASI e BLUMBERG, 1999). No entanto, o tratamento sistêmico com capsaicina em ratos no período neonatal, bem como em ratos adultos, promove neurotoxicidade nas fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina, resultando num efeito analgésico ainda mais duradouro. Após esse tratamento sistêmico, observa-se inchaço mitocondrial em fibras C localizados no GRD, nervo trigêmeo, gânglio nodoso além de destruição de fibras sensoriais, principalmente as do tipo C e algumas A δ , nas quais estão presentes os receptores TRPV1 (SUGIMOTO *et al.*, 1998; SZÖKE *et al.*, 2002). Esse fenômeno de neurotoxicidade seletiva, causado pela capsaicina nos neurônios sensoriais, resulta em pronunciada depleção de neuropeptídeos como a substância P e o CGRP, que estão implicados no processo de nocicepção e inflamação neurogênica (SZALLAZI e BLUMBERG, 1999). Como, após o tratamento com capsaicina, ocorre depleção desses neuropeptídeos dos neurônios sensoriais primários, pode-se então observar um efeito antinociceptivo em resposta a estímulos inflamatórios, térmicos ou químicos, além de uma redução da inflamação neurogênica (JANCSÓ *et al.*, 1977; HOLZER, 1991; SZALLASI e BLUMBERG 1999).

Confirmando os dados já demonstrados na literatura, nesse estudo observou-se que a capsaicina, quando administrada em ratos no período neonatal, causou pronunciada redução do efeito nociceptivo induzido por estímulos térmicos e químicos. De maneira semelhante, quando ratos foram tratados no período neonatal com os sesquiterpenos poligodial e drimanal, observou-se uma longa e pronunciada inibição da nocicepção neurogênica e da hiperalgesia térmica, nestes animais

quando adultos. Esse efeito foi muito semelhante àquele observado em animais tratados durante o período neonatal com capsaicina. Além disso, também foi evidenciado que o extravasamento plasmático induzido pela capsaicina, assim como aquele produzido pelo poligodial ou drimanial, foi significativamente reduzido nos animais tratados no período neonatal com essas substâncias. Interessantemente, o edema de pata de rato induzido pelo CFA não foi alterado pelo tratamento neonatal com capsaicina, poligodial ou drimanial, demonstrando que esse efeito não parece depender da ativação de fibras C ou A δ .

Os resultados obtidos com o tratamento de ratos no período neonatal com capsaicina também estão de acordo com dados da literatura que demonstram que o receptor TRPV1 está envolvido no extravasamento plasmático, particularmente via liberação de taquicininas e de CGRP de terminações nervosas sensíveis à capsaicina (SZOLCSANYI, 1996; SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Da mesma forma, o fato de não termos evidenciado redução no edema de pata causado pelo CFA em animais tratados no período neonatal com capsaicina, confirma os dados da literatura, nos quais têm demonstrado que mecanismos neurogênicos periféricos parecem não estar envolvidos no processo inflamatório induzido pelo CFA após o tratamento neonatal com capsaicina (REN *et al.*, 1994).

O tratamento sistêmico com capsaicina em ratos também causa diminuição da quantidade de receptores TRPV1 nos corpos celulares (GRD e no nervo trigêmio), no terminal do sistema nervoso central (medula espinhal), e no terminal periférico (bexiga urinária, traquéia, pele etc) de neurônios sensíveis a vanilóides (CATERINA e JULIUS, 2001), por causar morte de células neuronais e bloquear o transporte axonal (KAWAKAMI *et al.*, 2001; SZÖKE *et al.*, 2002). Nossos resultados demonstram que em ratos tratados no período neonatal com capsaicina, poligodial

ou drimanial ocorreu significativa redução da união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal. Confirmando os dados obtidos com o ensaio de união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de ratos, observamos que o tratamento de ratos no período neonatal com capsaicina também causou redução da expressão da proteína do TRPV1 no GRD. No entanto, o tratamento neonatal com drimanial não foi capaz de alterar a quantidade do receptor TRPV1 no GRD. Além disso, observamos que o tratamento neonatal com o poligodial parece ter causado aumento da quantidade de proteína do TRPV1 no GRD. Estes resultados podem decorrer do fato de que o poligodial induziu aumento na síntese protéica e/ou inibição da degradação da proteína do receptor TRPV1. No entanto, diferentemente de outros receptores que apresentam mecanismos que regulam a degradação de suas proteínas (BOUVIER *et al.*, 1995), pouco se sabe a respeito da possível degradação do TRPV1 ou se ainda esse evento ocorre com este receptor. Como neste estudo, não foi caracterizado se o tratamento neonatal com poligodial ou com drimanial causou degeneração das fibras sensoriais primárias com consequente redução do receptor TRPV1, não podemos descartar a hipótese de que esse tratamento tenha causado redução da afinidade da [³H]-resiniferatoxina pelo TRPV1 na medula espinhal de ratos.

Sendo assim, pode-se apenas sugerir que esse tratamento tenha promovido alguma alteração funcional nessas fibras, podendo essa alteração ser a responsável pelo efeito antinociceptivo observado neste estudo. Dentro desse contexto, podemos ainda sugerir que, após o tratamento neonatal com o poligodial ou drimanial, o TRPV1 não foi transportado do GRD para a medula espinhal, ou ainda, que o processo de transporte anterógrado do TRPV1 para terminações periféricas foi, de alguma forma, prejudicado por este tratamento. Se considerarmos esta hipótese,

podemos inferir que o efeito antinociceptivo causado após o tratamento neonatal com o poligodial ou com o drimanial, poderia estar ocorrendo por uma falha no transporte do TRPV1 do GRD para a medula espinhal e para terminações periféricas, o que resultaria no efeito antinociceptivo. No entanto, o fato destes compostos causarem efeitos semelhantes aos da capsaicina, como antinocicepção térmica e química, bem como redução do sítio de ligação do TRPV1 na medula espinhal de rato, sugere uma forte participação das fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina e uma possível ação direta no TRPV1. Contudo, como não foi evidenciada redução da proteína TRPV1 no GRD, o mecanismo de ação destes dois sesquiterpenos parece possivelmente envolver outro sítio de ação diferente ao da capsaicina. Sendo assim, os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antinociceptivos dos sesquiterpenos e da capsaicina parecem ser diferentes.

Atualmente, sabe-se que alguns estímulos, como fator de crescimento derivado da glia ou do nervo, induzem à síntese de TRPV1 no GRD (OGUNMUYIWA *et al.*, 1999), o qual pode ser transportado axonalmente para a terminação nervosa periférica e para o corno espinhal (GUO *et al.*, 1999; AMAYA *et al.*, 2003). Além disso, em situações dolorosas, como em processos inflamatórios e neuropáticos, ocorre aumento de TRPV1 no GRD e em terminais periféricos, por um mecanismo associado ao fator de crescimento do nervo (JI *et al.*, 2002; RASHID *et al.*, 2003). No entanto, o efeito antinociceptivo causado pelo poligodial e pelo drimanial não parece estar relacionado com a redução da proteína TRPV1 no GRD, mas possivelmente à redução do sítio de ligação ou da afinidade para a resiniferatoxina no TRPV1 presente na medula espinhal e, possivelmente, nas terminações periféricas. Outros estudos adicionais poderiam melhor esclarecer essa hipótese.

Como o poligodial e o drimanial são quimicamente distintos da capsaicina e da resiniferatoxina, torna-se difícil sugerir o mecanismo pelo qual esses compostos promovem efeitos semelhantes aos da capsaicina. No entanto, para melhor compreender o mecanismo pelo qual o poligodial e drimanial exercem suas ações farmacológicas, foi investigado se ambos sesquiterpenos poderiam interagir diretamente com a união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de rato. Nossos resultados demonstram que tanto o poligodial quanto o drimanial causaram deslocamento de maneira concentração-dependente da união específica para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal de rato. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Szallasi e colaboradores (1996) que demonstraram que poligodial causou inibição da união específica para a [³H]-resiniferatoxina com CI_{50} de $7,6 \pm 0,9 \mu M$.

Estudos de união específica tem demonstrado que a [³H]-resiniferatoxina possui uma alta afinidade ($K_d \approx 29 \pm 5 \text{ pM}$) e um grande número de sítios de ligação ($B_{max} 48 \pm 5 \text{ fmoles/mg proteína}$) na medula espinhal de rato (SZALLASI *et al.*, 1993). Além disso, estudos de competição demonstraram um K_i de $31,4 \pm 2,8 \text{ pM}$ para a resiniferatoxina não marcada, bem como um K_i de $0,3 \pm 0,1 \mu M$ ($CI_{50} \approx 3,6 \mu M$) para a capsaicina (SZALLASI *et al.*, 1993, ÁCS *et al.*, 1994). Sendo assim, os resultados encontrados no presente estudo para a capsaicina corroboram com os descritos na literatura. Esses resultados sugerem ainda que ambos sesquiterpenos poderiam estar atuando via ativação do TRPV1. Confirmando esta hipótese, tanto a capsaicina quanto o poligodial e o drimanial também promoveram marcada captação de cálcio em frações vesiculares da medula espinhal de rato, bem como aumento de cálcio intracelular em cultura de neurônios do nervo trigêmeo. De maneira semelhante ao poligodial e ao drimanial, muitos dialdeídos insaturados (como o

isoveleral e o cinamodial) e o triprenil fenol (como o scutigeral) inibem a união específica para a [³H]-resiniferatoxina e promovem captação de cálcio no GRD, além de apresentarem pungência na língua de humanos (SZALLASI *et al.*, 1996). Essas ações causadas por esses compostos naturais foram atribuídas a uma possível ativação do TRPV1 (STERNER e SZALLASI, 1999). Outros compostos naturais, como o gingerol e o ácido ricinoleico, também são atualmente conhecidos como ativadores do TRPV1 (LIDA *et al.*, 2003). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que o isoveleral e scutigeral, apesar de apresentarem ações semelhantes a capsaicina, não promovem aumento de cálcio intracelular quando avaliado em células HEK293 que expressam o hTRPV1 (RALEVIC *et al.*, 2003).

Com o objetivo de investigar mais precisamente o sítio de ação destes compostos, foram realizados estudos em células HEK293 transfectadas com o hTRPV1. Vários estudos demonstraram que a capsaicina e agonistas vanilóides causam mobilização de cálcio via ativação do TRPV1 (RALEVIC *et al.*, 2003; RIGONI *et al.*, 2003). No entanto, diferentemente dos agonistas vanilóides, o poligodial e o drimaniol não foram capazes de causar aumento de cálcio intracelular em células HEK293 transfectadas com o hTRPV1. Essa aparente discrepância obtida com os resultados referentes ao poligodial e drimaniol tanto na união específica para a [3H]-resiniferatoxina na medula espinhal de rato, como no aumento de cálcio intracelular em cultura de células do nervo trigêmio somados a incapacidade de ambos compostos em aumentar cálcio intracelular em células HEK293 transfectadas com hTRPV1, pode estar relacionada com algumas diferenças relatadas na literatura para o TRPV1 de humano e o de rato ou ainda, a diferenças entre os receptores TRPV1 presentes no sistema nativo e no sistema recombinante (SAVIDGE *et al.*, 2002, GAVVA *et al.*, 2004). A seqüência da proteína

para o TRPV1 de humano apresenta 85% de homologia com o TRPV1 de rato (SAVIDGE *et al.*, 2002). No entanto, as respostas mediadas pela ativação do TRPV1 podem variar dependendo da espécie de animal utilizada (SAVIDGE *et al.*, 2002, GAVVA *et al.*, 2004). As maiores variações na seqüência ocorrem nas porções amino e carboxi terminal, bem como na região proximal do poro do canal (HAYES *et al.*, 2000, McINTYRE *et al.*, 2001).

Apesar das respostas farmacológicas e eletrofisiológicas obtidas para o TRPV1 serem muito semelhantes entre as diferentes espécies, algumas diferenças podem ser observadas nas ações causadas pelo TRPV1 de rato e de humano. De fato, a capsazepina é efetiva em antagonizar as respostas produzidas por baixo pH e calor no TRPV1 de humano. No entanto em sistema nativo ou recombinante de rato a capsazepina é inefetiva em inibir estas resposta (McINTYRE *et al.*, 2001; SAVIDGE *et al.*, 2001).

Reforçando essas diferentes respostas observadas entre sistemas recombinantes expressando o TRPV1 e sistemas nativos, a resiniferatoxina e seu análogo o forbol 12-fenilacetato 13-acetato 20-homovanilato (PPAHV) apresentaram baixa sensibilidade no sistema recombinante (células HEK293 expressando o hTRPV1), em relação ao sistema nativo no GRD de rato (SHIN *et al.*, 2001). Além disso, Caterina *et al.*, (1997) demonstraram que a resiniferatoxina é menos potente em ativar o TRPV1 expresso em *oócitos de Xenopus* com CE_{50} de 0,039 μ M quando comparada com o efeito observado no TRPV1 de sistema nativo (CE_{50} de 0,004 μ M). Por outro lado, em sistema recombinante (células HEK293 expressando o hTRPV1) foi demonstrado que a capsaicina e seu análogo o DA-5018 apresentam maior eficácia em produzir suas respostas quando comparado com a resposta obtida em sistema nativo no GRD de rato (SHIN *et al.*, 2001). Estes resultados estão de

acordo com os obtidos neste trabalho, que demonstra uma grande sensibilidade para a capsaicina em células HEK293 transfectadas com hTRPV1, quando comparado com receptores nativos do gânglio do nervo trigêmio de rato.

As diferenças no perfil farmacológico observado no TRPV1 em sistema nativo sugerem uma possível existência de subtipos de receptores para capsaicina em neurônios sensoriais. Essas diferenças sugerem ainda, a presença de proteínas acessórias associadas com o TRPV1 que poderiam regular a sensibilidade desse receptor para diferentes tipos de agonistas (SHIN *et al.*, 2001). Atualmente, sabe-se que o TRPV1 está acoplado com várias proteínas acessórias, incluindo a PLC (PRESCOTT e JULIUS, 2003), PKC (PREMKUMAR *et al.*, 2000), PKA (BHAVE *et al.*, 2002), calmodulina (NUMAZAKI *et al.*, 2003) e proteínas vesiculares, como a sinaptotagmina (MORENILLA-PALAO *et al.*, 2004).

Dessa forma, é possível sugerir que o poligodial e o drimanial também possam estar interagindo com outros alvos para produzir suas ações.

O fato dos dialdeídos insaturados não apresentarem grupamento homovanílico semelhante ao da capsaicina e atuarem, pelo menos em parte, via ativação do TRPV1 é intrigante. Apesar de ainda não estar estabelecido como esse mecanismo ocorre, tem sido sugerido que algumas ações dos sesquiterpenos dialdeídos insaturados estão relacionadas com a reatividade química destes compostos em torno da cadeia de aminoácidos contendo grupos nucleofílicos, especificamente resíduos de cisteínas e lisinas (JOHSSHON e STERNER, 1997). De fato, o efeito protetor do poligodial na úlcera gástrica induzida por etanol foi demonstrado ser dependente da interação com grupos sulfidrilas (MATSUDA *et al.*, 2002). Além disso, agentes redutores e oxidantes também podem ativar neurônios sensíveis à capsaicina (EVANGELISTA *et al.*, 1992) e interferir com a união

específica para a [³H]-resiniferatoxina (SZALLASI e BLUMBERG, 1993).

O TRPV1 contém vários resíduos de cisteínas e lisinas que são essenciais para sua função e para a ligação do agonista no canal (VYKLICKY *et al.*, 2002). Sendo assim, essa poderia ser uma hipótese plausível para melhor explicar o mecanismo pelo qual o poligodial e o drimaniol conseguem atuar nas fibras sensíveis a capsaicina e interferir na união específica para a [³H]-resiniferatoxina. No entanto, o TRPV1 parece não ser a única proteína pela qual os dialdeídos insaturados interagem para promover suas ações farmacológicas. De fato, Forsby *et al.* (1994) já haviam demonstrado que em células de neuroblastoma SH-SY5Y, o isoveleral e o poligodial causavam aumento na concentração de cálcio intracelular, mediado, em parte, pelo fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) por meio da ativação de PLC (FORSEBY e WALUAM, 1996). No entanto, o mecanismo pelo qual o isoveleral e o poligodial causavam esse aumento de cálcio intracelular não foi investigado. Mesmo assim, Forsby e Waluam (1996) sugeriram que ambos dialdeídos poderiam possivelmente estar causando mobilização de fosfatidilinositol.

Existem grandes evidências demonstrando que fibras sensoriais inervando a bexiga urinária são sensíveis a capsaicina (AVELINO *et al.*, 2002). Um importante papel exercido pelo TRPV1 na bexiga urinária foi recentemente confirmado com o uso de camundongos com deleção gênica para o TRPV1 (BIRDER *et al.*, 2002). Esses animais apresentam funções alteradas como redução da amplitude de contração e retenção urinária (BIRDER *et al.*, 2002). A capsaicina ao ativar o TRPV1 promove influxo de cálcio resultando em vários eventos intracelulares, que levam a liberação de neuropeptídeos de neurônios sensoriais como a substância P e o CGRP de terminais periféricos e centrais. Essa estimulação de receptores taquicinérgicos está diretamente relacionada com várias ações da capsaicina,

incluindo a contração da bexiga urinária (GEPETTI e TREVISANI, 2004).

Semelhante a capsaicina, o poligodial e o drimantal causaram contração na bexiga urinária isolada de rato, sendo este efeito inibido pela associação de antagonistas dos receptores NK₁ e NK₂ ou pelo antagonista não seletivo do TRPV1, o vermelho de rutênio. No entanto, antagonistas seletivos do TRPV1 como a capsazepina e a iodo-resiniferatoxina inibiram parcialmente a contração induzida pelo poligodial, sem interferir na contração causada pelo drimantal.

Estes resultados sugerem que o poligodial e o drimantal causam contração na bexiga isolada de rato via ativação de canais sensíveis ao vermelho de rutênio, bem como via liberação de neuropeptídeos.

Em 1990, Patacchini e colaboradores já haviam demonstrado que alguns compostos naturais pungentes como a piperina, eugenol, curcumina e o óleo de mostarda induzem contração de maneira concentração dependente na bexiga isolada de rato. Esta resposta contrátil foi demonstrada ser inibida pelo vermelho de rutênio, um antagonista não seletivo do TRPV1, sugerindo que estes compostos causavam ativação de neurônios sensoriais (PATACCHINI *et al.*, 1990).

Recentemente, estudos têm demonstrado que o óleo de mostarda estimula um outro receptor membro da família dos TRPs, conhecido como ANKTM1 ou TRPA1 (BANDELL *et al.*, 2004; JORDT *et al.*, 2004). O ANKTM1 é expresso em um subgrupo de neurônios sensoriais que expressam o TRPV1 e neuropeptídeos como o CGRP e a substância P (STORY *et al.*, 2003). Este receptor é ativado por temperatura em torno de 17 °C, que, em humanos, produz sensação de frio nocivo (STORY *et al.*, 2003). Como o TRPV1 e o ANKTM1 encontram-se em fibras que detectam calor ou frio nocivo, a ativação dessas fibras por diferentes estímulos pode ser interpretada de maneira semelhante, pois os neurônios espinhais de segunda

ordem não conseguem fazer essa diferenciação (McKEMY *et al.*, 2002). Tais resultados poderiam explicar a sensação de queimação que os humanos sentem após exposição a frio intenso (McKEMY *et al.*, 2002). Da mesma maneira, poderiam também explicar porque compostos naturais, como o óleo de mostarda, quando aplicado na pele produz sensação de queimação, inflamação e uma hipersensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, porém suas ações são mediadas via ativação do ANKTM1 (JORDT *et al.*, 2004). Recentemente, Bandell e colaboradores (2004) demonstraram que outros compostos naturais presentes no gengibre (gingerol), óleo do cravo da Índia (metil salicilato) no óleo de cinamomo (aldeído cinâmico), que causam sensação de queimação em humanos, ativam o receptor ANKTM1 (BANDELL *et al.*, 2004). Semelhante à capsaicina, o aldeído cinâmico também causa hiperalgesia térmica em camundongos (BANDELL *et al.*, 2004), possivelmente pela liberação de substância P e CGRP via ativação do ANKTM1 (JULIUS E BASBAUM, 2001; BANDELL *et al.*, 2004). No entanto, permanece por ser esclarecido se o poligodial e o drimanial podem promover seus efeitos por estarem atuando via ativação do ANKTM1.

Em conclusão, os resultados deste estudo demonstraram de que o tratamento neonatal com o poligodial ou com o drimanial, a exemplo do mesmo tratamento com a capsaicina, causou inibição marcante da nocicepção neurogênica, hiperalgesia térmica e do extravasamento plasmático, seguido por uma marcada redução no sítio de ligação específico ou ainda uma possível redução da afinidade dos receptores TRPV1 para a [³H]-resiniferatoxina na medula espinhal. Além disso, ambos sesquiterpenos, assim como a capsaicina, promoveram aumento da captação de cálcio em fração vesicular da medula espinhal de rato, bem como inibiram a união específica para a [³H]-resiniferatoxina. Apesar desses efeitos serem

muito semelhantes aos observados para a capsaicina, tanto o poligodial como o drimaniol não foram capazes de aumentar o cálcio intracelular quando analisados em células HEK293 transfectadas com hTRPV1. Entretanto, ambos poligodial e drimaniol causaram aumento de cálcio intracelular em cultura do gânglio do nervo trigêmeo de rato. Além disso, a contração da bexiga isolada de rato causada pelo poligodial e pelo drimaniol foi inibida pelos antagonistas dos receptores NK₁ e NK₂ e pelo antagonista não seletivo do TRPV1, o vermelho de rutênio. Por outro lado, a contração causada pelo poligodial, mas não pelo drimaniol, foi ainda que parcialmente, inibida pela capsazepina e pela iodo-resiniferatoxina. Em conjunto, esses resultados permitem sugerir que apesar de alguns efeitos induzidos pelo poligodial e pelo drimaniol serem semelhantes aos observados pela capsaicina, suas ações farmacológicas parecem não estar exclusivamente relacionadas com ativação direta do TRPV1. Possivelmente, ambos sesquiterpenos poderiam estar atuando via outros alvos farmacológicos, incluindo a interação com outros membros da família TRP, como por exemplo o ANKTM1. Assim, os mecanismos precisos pelos quais o poligodial e o drimaniol causam seus efeitos ainda não estão esclarecidos, sendo que outros estudos deverão ser realizados, a fim de melhor esclarecer as vias pelas quais esses compostos exercem seus efeitos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Acs, G., Lee, J., Marquez, V.E., Blumberg, P.M. Distinct structure-activity relations for stimulation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. *Mol. Brain Res.*, 35, 173-182, 1996.
- Acs, G., Palkovits, M., Blumberg, P.M. Comparison of [^3H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic na vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci.*, 55: 1017-1026, 1994.
- Amaya, F., Oh-hashi, K., Naruse, Y., Iijima, N., Ueda, M., Shimosato, G., Tominaga, M., Tanaka, Y., Tanaka, M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurones. *Brain Res.*, 963: 190-196, 2003.
- Andre, E., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Role of nitric oxide and K^+ channels in relaxation induced by polygodial in rabbit corpus cavernosum in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 41: 300-306, 2003.
- André, E., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Mechanisms underlying the relaxation caused by the sesquiterpene polygodial in vessels from rabbit and guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.*, 386: 47-53, 1999.
- Augustine, G.J., Charlton, M.P., Smith, S.J. Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann. Rev. Neurosci.*, 10: 633, 1987.
- Avelino, A., Cruz, C., Nagy, I., Cruz, F. Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience*, 109: 787-789, 2002.

- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41: 849-857, 2004.
- Bevan, S., Docherty, R.J. Cellular mechanisms of the action of capsaicin. In: *Capsaicin in the study of pain.* (ed. Wood, J.N.), Academic Press, San Diego, CA, 27-44, 1993.
- Bevan, S., Holthi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S.J., Yeats, J.C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 544-552, 1992.
- Bevan, S., James, I.F., Rang, H.P., Winter, J., Wood, J.N. The mechanism of action of capsaicin: a sensory neurotoxin. In: *Neurotoxins and their Pharmacological Applications.* (ed. P.Jenner), Raven Press, New York, 261-277, 1987.
- Bevan, S., Szolcsányi, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanism and applications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 330-333, 1990.
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., Gereau, R.W.T. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35: 721-731, 2002.
- Birder, L.A., Kanai, A.J., De Groat, W.C., Kiss, S., Nealen, M.L., Buke, N.E., Dineley, K.E., Watkins, S., Reynolds, I.J., Caterina, M.J. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 13396-13401, 2001.
- Birder, L.A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M.L., Barrick, S., Kanai, A.J., Wang, E., Ruiz, G., De Groat, W.C., Apodaca, G., Watkins, S., Caterina, M.J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat. Neurosci.*, 5: 856-860, 2002.

- Bouvier, M., Loisel, T.P., Hebert, T. Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 577-581, 1995.
- Buck, S.H., Burks, T.F. The neuropharmacology of capsaicin: a review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.*, 38: 179-226, 1986.
- Calixto, J.B., Scheidt, C., Otuki, M., Santos, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 6: 261-279, 2001.
- Canonica, L., Corbella, P., Gariboldi, G., Jommi, G., Krepinsky, J., Ferrari, G., Casagrande, C. Sesquiterpenoids of *Cinnamosma fragrans* Baillon. Structure of cinnamolide, cinnamosmolide and cinnamodial. *Tetrahedron*, 25: 3895-3902, 1969.
- Caterina, M.J., Julius, D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Ann. Rev. Neurosci.*, 24: 487-517, 2001.
- Caterina, M.J., Leffeler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288: 306-313, 2000.
- Caterina, 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*, 389: 816-824, 1997.
- Cechinel-Filho, V., Schlemper, V., Santos, A.R., Pinheiro, T.R., Yunes, R.A., Mendes, G.L., Calixto, J.B., Delle Monache, F. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.*, 62: 223-227, 1998.

- Clapham, D.E.; Montell, C., Schultz G., Julius D. International union of pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.*, 55: 591-596, 2003.
- Cruz, F., Silva, M., Guimarães, M., Reis, M. Desensitization of bladder afferents by resiniferatoxin for treatment of detrusor hyperreflexia. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 24: 635-638, 1998.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A., Sheardown, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405: 183-187, 2000.
- De Groat, W.D. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology*, 50: 36-52, 1997.
- Dedov, N.V., Tran, H.V., Duke, C.C., Connor, M., Christie, J.M.D., Mandadi, S., Roufogalis, D.B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *Br. J. Pharmacol.*, 137: 793-798, 2002.
- Docherty, R.J., Roberttson, B., Bevan, S. Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult rat dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience*, 40: 513-521, 1991.
- Docherty, R.J., Yeats, J.C., Bevan, S., Boddeke, H.W. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitisation of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* 431: 828-837, 1996.
- Doly, S., Fischer, J., Salio, C., Cnrath, M. The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neuroscience*, 357: 123-126, 2004.

- Driedger, P.E., Blumberg, P.M. Different biological targets for resiniferatoxin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Cancer Res.*, 40: 1400-1404, 1980.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4: 161-174, 1977.
- El Sayah, M.E., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Pinheiro, T.R., Calixto, J.B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 344: 215-221, 1998.
- Evangelista, S., Renzi, D., Guzzi, P., Surrenti, C., Santicioli, P., Maggi, C. A. Capsaicin-like activity of N-ethylmaleimide in rat stomach. *Gen. Pharmacol.*, 23: 39-41, 1992.
- Ferreira, J., Da Silva, G.L., Calixto, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 141: 787-794, 2004
- Forsby, A., Walum, E. Polygodial induces inositol phosphate turnover in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.*, 217: 50-54, 1996.
- Forsby, A., Witt, R., Walum, E. Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes increase the concentration of intracellular free Ca^{2+} in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Nat. Toxins*, 2: 89-95, 1994.
- Gamse, R., Wax, A., Zigmond, R.E., Leeman, S.E. Immunoreactive substance P in sympathetic ganglia: distribution and sensitivity towards capsaicin. *Neuroscience*, 6: 437-441, 1981.
- Gamse, R.; Petsche, U.; Lembeck, F.; Jancsó, G. Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res.*, 239, 447-462, 1982.

- Gavva, N.R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T.J., Viswanadhan, V.N., Toth, A., Pearce, L.V., Vanderah, T.W., Porreca, F., Blumberg, P.M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J.C., Treanor, J.S. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J. Biol. Chem.* 279: 20283-20295, 2004.
- Geppetti, P., Holzer, P. *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
- Geppetti, P., Trevisani, M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br. J. Pharmacol.*, 141: 1313-1320, 2004.
- Goso, C., Evangelista, S., Tramontana, M., Manzini, S., Blumberg, P.M., Szallasi, A. Topical capsaicin protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNB)-induced colitis in the rat: characterization of the vanilloid (capsaicin) receptor involved. *Eur. J. Pharmacol.*, 249: 185-190, 1993.
- Graves, G. *Medicinal Plants*, pp. 116-118, Randon House, 1996.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X., Elde, R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (TRPV1): Relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 946-958, 1999.
- Gupta, M. 270 *Plantas Mediciniais Iberoamericanas*, Convênio Andres Bello, Ed. Gupta, M. Colombia, 574-576, 1995.
- Hangay, O. *A paprikarol, tekintettel a regi fuszerekre. Szamueb imre nyomdaja, Szekes-Fehervar (Hungary)*, 1887.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32: 77-78, 1988.

- Harrison, S., De Petrocellis, L., Trevisani, M., Benvenuti, F., Bifulco, M., Geppetti, P., Di Marzo, V. Capsaicin-like effects of N-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.*, 475: 107-114, 2003.
- Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., Barton, A.J., Medhurst, A.D., Smith, G.D, Topp, S., Murdock, P., Sanger, G.J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C.D., Randall, A.D., Gloger, I.S., Davis, J.B. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, 88: 205-215, 2000.
- Hergenbahn, M., Adolf, W., Hecker, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. *Tetrahedron Lett.*, 19: 1595-1598, 1975.
- Holzer, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, 43: 143-201, 1991.
- Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24: 739-768, 1988.
- Holzer, P., Pabst, M.A., Lippe, I.T., Peskar, P.H. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. *Gastroenterology*, 98: 838-848, 1990.
- Honda, H., Shibuya, T., Salafsky, B. Brain synaptosomal Ca^{2+} uptake: Comparison of Sprague-Dawley, Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem and Mol Biol*, 95: 555-558, 1990 .

- Hu, H.J., Bhave, G., Gereau, R.W. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J. Neurosci.*, 22: 7444-7452, 2002.
- Hwang, S.W., Cho, h., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., Oh, U. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6155-6160, 2000.
- Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K., Denda, M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291:124-129, 2002.
- James, I.F., Walpole, C.S.J., HiXON, J., Wood, J.N., Wrigglesworth, R. Long-lasting agonist activity produced by a capsaicin-like photoaffinity probe. *Mol. Pharmacol.*, 33: 643-649, 1988.
- Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gabor, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 270: 741-743, 1977.
- Jancsó, N. Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. In: Lin, K., Armstrong, D., Pardo, E.G. (eds), *Pharmacology of pain*. Pergamon, Oxford, 33-55, 1968.
- Jancsó, N. Stoffanreicherung in Retikuloendothelial und in der Niere. Budapest, Aladérmiai Kiadó, Speicherung, 1955.
- Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A. Desensitization of sensory nerve endings (in Hungarian). *Kiserletes Orvostudomány (Supl)* 2:15, 1949.

- Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A., Szolcsanyi, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pre-treatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, 31: 138-151, 1967.
- Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., Schmoll, R., Woolf, C.J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36: 57-68, 2002.
- Jonassohn, M., Sterner, O. Terpenoid unsaturated 1,4-dialdehydes, occurrence and biological activities. *Trends Org. Chem.*, 6: 23-43, 1997.
- Jordt, S.E., Bautista, Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestatt, I.D.M., Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427: 260-265, 2004.
- Juang, J., Hwang, S.W., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C., Kim, W.B., Kim, D., Oh, U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J. Neurosci.*, 19: 529-538, 1999.
- Julius, D., Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.
- Kawakami, T., Hikawa, N., Kusakabe, T., Kano, M., Bandou, Y., Gotoh, H., Takenaka, T. Mechanism of inhibitory action of capsaicin on particulate axoplasmic transport in sensory neurons in culture. *J. Neurobiol.*, 24: 545-551, 2001.
- Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., Blumberg, P.M., Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.*, 276: 28613-18619, 2001.

- Kudo, Y., Ozaki, K., Miyakawa, A., Amano, T., Ogura, A. Monitoring of intracellular Ca^{2+} elevation in a single neural cell using a Fluorescence microscope/video-camera system. *Jpn. J. Pharmacol.*, 41: 345-151, 1986.
- Leal, B.R., Cordova, M.F., Herd, L., Bobrovskaya, L., Dunkley, R.P. Lead-stimulated p38^{MAPK}-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 178: 44-51, 2002.
- Lida, t., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., Fushiki, T., Yazawa, S., Watanabe, T., Tominaga, M. TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsaiate. *Neuropharmacology*, 44: 958-967, 2003.
- Lippe, I.T., Lorbach, M., Holzer, P. Close arterial infusion of calcitonin gene-related peptide into the rat stomach inhibits aspirin-and ethanol-induced hemorrhagic damage. *Regul. Pept.*, 26: 35-46, 1989.
- Lynn, B. Capsaicin: actions on nociceptive C-fibers and therapeutic potential. *Pain* 41: 61-69, 1990.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Tramontana, M., Amann, R., Giuliani, S., Santicioli, S. Similarities and differences in the action of resiniferatoxin and capsaicin on central and peripheral ending of primary sensory neurons. *Neuroscience*, 37: 531-539, 1990.
- Malheiros, A., Filho, V.C., Schmitt, C.B., Santos, A.R.S., Scheidt, C., Calixto, J.B., Monache, F.D., Yunes, R.A. A sesquiterpene drimane with antinociceptive activity from *Drimys winteri* bark, *Phytochemistry*, 57: 103-107, 2001.
- Marsh, S.J., Stansfeld, C.E., Brown, D.A., Davey, R., McCarthy, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons *in vitro*. *Neuroscience*, 23: 275-289, 1987.

- Matsuda, H., Pongpiriyadacha, Y., Morikawa, T., Kashima, Y., Nakano, K., Yoshikawa, M. Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirements and mode of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 477-482, 2002.
- McIntyre, P., McLatchie, L.M., Chambers, A., Phillips, E., Clarke, M., Savidge, J., Toms, C., Peacock, M., Shah, K., Winter, J., Weerasakera, N., Webb, M., Rang, H.P., Bevan, S., James, I.F. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br. J. Pharmacol.*, 132: 1084-1094, 2001.
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416: 52-58, 2002.
- Mendes, G.L., Santos, A.R., Campos, M.M., Tratsk, K.S., Yunes, R.A., Cechinel-Filho, V., Calixto, J.B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci.*, 63: 369-381, 1998.
- Mendes, G.L., Santos, A.R., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 164-172, 2000.
- Mezey, E., Toth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P.M., Szallasi, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 3655-3660, 2000.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108: 595-598, 2002.

- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Ferrer-Montiel, A.A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.*, 279: 25665-25672, 2004.
- Morton, J.F. Atlas of medicinal plants in middle america-bahamas to Yucatan. (ed. Charles C. Thomas), 219, Springfield, USA, 1981 .
- Nelson, E.K. The constitution of capsaicin – the pungent principle of capsicum I. *J. Am. Chem. Soc.*, 41: 1115-1119, 1919.
- Nelson, E.K. The constitution of capsaicin – the pungent principle of capsicum II. *J. Am. Chem. Soc.*, 42: 597-601, 1920.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., Tominaga, M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Nat. Acad. Sciences U.S. A*, 100: 8002-8006, 2003.
- Ogun-Muyiwa, P., Helliwell, R., McIntyre, P., Winter J. Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. *Neuroreport*, 10: 2107-2111, 1999.
- Oh, U., Hwang, S.W., KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 16: 1659-1667, 1996.
- Parlani, M., Conte, B., Goso, C., Szallasi, A., Manzini, S. Capsaicin-induced relaxation in the isolated rat external urethral sphincter: characterization of the vanilloid receptor and mediation by CGRP. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 989-994, 1993.
- Patacchini, R., Maggi, C.A., Meli. Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 342: 72-77, 1990.

- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., Viswanath, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 529-539, 2003.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, L., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108: 705-715, 2002.
- Petersen, M., Pierau, F.K., Weyrich, M. The influence of capsaicin on membrane currents in dorsal root ganglion neurones of guinea-pig and chicken. *Pflugers Arch.*, 409: 403-410, 1987.
- Pio Corrêa. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, 2: 112, 1978.
- Premkumar, L.S., Ahern, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408: 985-990, 2000.
- Prescott, E.D., Julius, D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300: 1284-1288, 2003.
- Ralevic, V., Jerman, J.C., Brough, S.J., Davis, J.B., Egerton, J., Smart, D. Pharmacology of vanilloids at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 65: 143-151, 2003.
- Rang, H.P., Bevan, S.J., Forbes, A., Wood, J.N. The action of capsaicin on the membrane of sensory neurones. IUPHAR Satellite Symposium, Tools for tachykinin and neuropeptide research, 29-30 August, Salamander Bay, Abstr. Book, 29, 1987.
- Rashid, M.H., Inoue, M., Kondo, S., Kawashima, T., Bakoshi, S., Ueda, H. Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the

- analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 940-948, 2003.
- Ren, K., Williams, G.M., Ruda, M.A. Dubner, R. Inflammation and hyperalgesia in rats neonatally treated with capsaicin: effects on two classes of nociceptive neurons in the superficial dorsal horn, *Pain*, 59: 287-300, 1994.
- Ricceri, T.M.N. *Bibliografia de plantas medicinais. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 1: 224, 1981.
- Rigoni, M., Trevisani, M., Gazzieri, D., Nadaletto, R., Tognetto, M., Creminon, C., Davis, J.B., Campi, B., Amadesi, S., Geppetti, P., Harrison, S. Neurogenic responses mediated by vanilloid receptor-1 (TRPV1) are blocked by the high affinity antagonist, iodo-resiniferatoxin. *Br. J. Pharmacol.*, 138: 977-985, 2003.
- Savidge, J., Davis, C., Shah, K., Colley, S., Phillips, E., Ranasinghe, S., Winter, J., Kotsonis, P., Rang, H., McIntyre, P. Cloning and functional characterization of the guinea pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology*, 43: 450-456, 2002.
- Savidge, J.R., Ranasinghe, S.P., Rang, H.P. Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1. *Neuroscience*, 102: 177-184, 2001.
- Scheidt, C., Santos, A.R., Ferreira, J., Malheiros, A., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. *Neuropharmacology*, 43: 340-347, 2002.
- Shin, J.S., Wang, M.H., Hwang, S.W., Cho, H., Cho, S.Y., Kwon, M.J., Lee, S.Y., Oh, U. Differences in sensitivity of vanilloid receptor 1 transfected to human embryonic kidney cells and capsaicin-activated channels in cultured rat dorsal

- root ganglion neurons to capsaicin receptor agonists. *Neurosci. Lett.*, 299: 135-139, 2001.
- Simões, C.M.O., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Irgang, B.E., Stehmann, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: ed. Da UFRGS, 46-47, 1986.
- Sterner, O., Szallasi, A. Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drugs development. *Trends Pharmacol Sci* 20: 459-465, 1999.
- 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*, 112: 819-829, 2003.
- Sugimoto, T., Xiao, C., Ichikawa, H. Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves na apoptotic mechanism. *Brain Res.*, 807: 147-154, 1998.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. [³H]Resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arc. Pharmacol.*, 347: 84-91, 1993.
- Szallasi, A., Biró, T., Modarres, S., Garlaschelli, L., Peterson, M., Klusch, A., Vidari, G., Jonassohn, M., De Rosa, S., Sterner, O., Blumberg, M.P., Krause, E.J. Dialdehyde sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *Eur. J. Pharmacol.*, 356: 81-89, 1998.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sci.*, 47: 1399-1408, 1990a.

- Szallasi, A., Blumberg, P.M. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res.*, 524: 106-111, 1990b.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.*, 51: 159-212, 1999.
- Szallasi, A., Goso, C., Blumberg, P.M., Manzini, S. Competitive inhibition by capsazepine of [³H]resiniferatoxin binding to central (Spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and Airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267: 728-733, 1993.
- Szallasi, A., Jonassohn, M., Acs, G., Biro, T., Acs, P., Blumberg, P.M., Sterner, O. The stimulation of capsaicin-sensitive neurones in a vanilloid receptor-mediated fashion by pungent terpenoids possessing an unsaturated 1,4-dialdehyde moiety. *Br. J. Pharmacol.*, 119: 283-290, 1996.
- Szallasi, A. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen. Pharmacol.*, 25: 223-243, 1994.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, 30: 515-520, 1989.
- Szebeni, A., Jancsó, G., Wolleman, M. Capsaicin receptor binding. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 51: 13, 1978.
- Szöke, E., Seress, L., Szolcsányi, L. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*, 113: 925-937, 2002.

- Szolcsányi, J. Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory. In: Geppetti, P., Holzer, P. (Eds). Neurogenic Inflammation. CRC, Boca Raton, FL, 35-44, 1996.
- Szolcsányi, J., Jancsó-Gabor. Sensory effects of capsaicin congeners. II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. Drug Res., 26: 33-37, 1975.
- Tominaga M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron, 21: 531-543, 1998.
- Tratsk, K.S., Campos, M.M., Vaz, Z.R., Cechinel-Filho, V.C., Schlemper, V., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. Inflamm. Res., 46: 509-514, 1997.
- Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M.J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J.C., Brough, S.J., Owen, D., Smith, G.D., Randall, A.D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J.B., Geppetti, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. Nat. Neurosci., 5: 546-551, 2002.
- Uchida, M., Yano, S., Watanabe, K. The role of capsaicin sensitive nerves in protective effect of capsaicin against absolute ethanol-induced gastric lesions in the rats. Jpn. J. Pharmacol., 55: 279-282, 1991.
- Urbán, L., Dray, A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonizes the effects of capsaicin in the mouse spinal corn *in vitro*. Neurosci. Lett., 134: 9-11, 1991.

- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A.. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* 534: 813-825, 2001.
- Vyklicky, L., Lyfenko, A., Susankova, K., Teisinger, J., Vlachova, V. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience*, 111: 435-441, 2002.
- Walker, K.M., Urban, L., Medhurst, S.J., Patel, S., Panesar, M., Fox, A.J., McIntyre, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304: 56-62, 2003.
- Whittet, T.D. Peppers, spicers and grocers-forerunners of the apothecaries. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 61: 801-806, 1968.
- Yaksh, T.L., Farb, D.I.I., Leeman, S.E., Jessell, T.M. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science*, 206: 481-483, 1979.
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400: 452-457, 1999.