

Diogo Santos Martins da Costa

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL  
TRANSITÓRIO A1 (TRPA1) NA MANUTENÇÃO DA  
HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA (FRIO) NA  
INFLAMAÇÃO PERSISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Dr. Emerson Marcelo Motta

Florianópolis  
2010



Diogo Santos Martins da Costa

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL  
TRANSITÓRIO A1 (TRPA1) NA MANUTENÇÃO DA  
HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA (FRIO) NA  
INFLAMAÇÃO PERSISTENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Dr. Emerson Marcelo Motta

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da

Universidade Federal de Santa Catarina

C837e Costa, Diogo Santos Martins da

Envolvimento do receptor de potencial transitório A1 (TRPA1) na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica (Frio) na inflamação persistente [dissertação] / Diogo Santos Martins da Costa ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2010.  
79 p: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Inflamação persistente. 3. Hiperalgesia. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos especiais ao Professor Calixto, pela dedicação prestada durante todo o tempo em que frequentei seu laboratório, mostrando o verdadeiro mundo da farmacologia e me presenteando a cada dia com seus ensinamentos e com seu amor pela pesquisa científica no Brasil.

Ao meu amigo e co-orientador Emerson Motta, que contribuiu de forma ímpar na realização desse trabalho.

A minha querida amiga Ednéia com suas colaborações infindáveis e pelo seu carinho e atenção.

Aos amigos do LAFEX, pelos bons momentos vividos.

Aos amigos do Castelo, que me deram a oportunidade de conhecer o mundo inteiro dentro de uma casa.

Aos amigos Sambaqui, que me receberam de braços abertos onde aqui fiquei.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, que me deram todo o suporte necessário para se descobrir um mundo nunca vivido.

A todos os outros amigos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho e uma vida nova pudessem nascer.



## RESUMO

O presente estudo investiga o papel do receptor TRPA1 no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica e inflamatória na inflamação persistente induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos. A injeção intraplantar (i.pl.) de CFA induz uma hiperalgesia de longa duração (28 dias) para o estímulo mecânico e térmico. A injeção intraperitoneal (i.p., 30-300 mg/kg), intraplantar (i.pl., 100 µg/sítio) ou intratecal (i.t., 10 µg/sítio) do antagonista seletivo dos receptores TRPA1, o HC-030031, reduz significativamente a hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste de filamentos de von Frey. Entretanto, a injeção intracerebroventricular (i.c.v., 10 µg/sítio) do HC-030031 não interfere na hiperalgesia induzida por CFA. O tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) inibe completamente a hiperalgesia ao frio nocivo induzido pelo tetrafluoroetano em camundongos que receberam CFA. O pré-tratamento com o RNA de interferência contra o receptor TRPA1 (AS-ODN, i.t.) previne significativamente a hiperalgesia mecânica e térmica. Interessantemente, tanto a expressão da proteína quanto o RNA mensageiro apresentam de forma aumentada na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal (GRD) em camundongos tratados com CFA, efeito esse que foi reduzido pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo do TRPA1, o HC-030031. Esses dados em conjunto, mostram que o receptor TRPA1 presente na periferia ou no SNC em níveis espinhais desempenham um importante papel no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica (frio) durante o quadro inflamatório induzido pelo CFA. Deste modo, o bloqueio seletivo dos receptores TRPA1 representa uma estratégia farmacológica promissora no tratamento da hiperalgesia em estados de inflamação persistente.

**Palavras-chave:** TRPA1, Inflamação persistente, hiperalgesia mecânica e frio.





## ABSTRACT

This study investigated the role of TRPA1 in the development and maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) in mice. The intraplantar (i.pl.) injection of CFA induced a long lasting (28 days) hyperalgesia for both mechanical and thermal (cold) stimuli. The intraperitoneal (i.p., 30–300 mg/kg), intraplantar (i.pl., 100 lg/site) or intrathecal (i.t., 10 lg/site) injection of the TRPA1 selective antagonist HC-30031 significantly reduced the mechanical hyperalgesia evaluated by the von Frey hair test. The effect of HC-030031 was evidenced on the day after CFA injection and was kept throughout the test. However, the intracerebroventricular (i.c.v., 10 lg/site) injection of HC-030031 did not interfere with CFA-induced hyperalgesia. Treatment with HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) completely inhibited the noxious cold hyperalgesia induced by tetra fluoroethane in mice that received CFA. The pre-treatment with the TRPA1 oligonucleotide antisense (AS-ODN, i.t.) consistently prevented both mechanical and cold hyperalgesia. Interestingly, both TRPA1 protein expression and mRNA were over-expressed in spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) of mice treated with CFA, an effect that was fully prevented by the pre-treatment with the TRPA1 antagonist HC-030031. Collectively, the present results showed that TRPA1 present at either peripheral or spinal sites play a relevant role in the development and maintenance of both mechanical and cold hyperalgesia during CFA-induced inflammation. Thus, TRPA1 selective antagonists represent promising candidates to treat hyperalgesia in persistent inflammatory states.

Keywords: TRPA1, Persistent inflammation, Col and mechanical hyperalgesia.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efeito do pós-tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....24
- Figura 2. Efeito do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....25
- Figura 3. Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sob a hiperalgesia mecânica crônica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....27
- Figura 4. Efeito do tratamento periférico ou central com o antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sobre a hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....30
- Figura 5. Efeito do tratamento periférico ou central com o antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sobre a hiperalgesia mecânica tardia induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....31
- Figura 6. Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sob a hiperalgesia térmica aguda ao frio nocivo induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.34
- Figura 7. Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia térmica crônica ao frio, induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.....35
- Figura 8. Efeito da administração i.t. do antisense contra o receptor TRPA1 (TRPA1 AS-ODN) na hiperalgesia mecânica induzida por CFA.....37
- Figura 9. Efeito da administração do antisense TRPA1 (TRPA1 AS-ODN) sobre a hiperalgesia térmica ao frio induzida por CFA.....38
- Figura 10. Aumento da expressão do receptor TRPA1 na medula espinhal de camundongos após a injeção i.pl. de CFA.....40

Figura 11. Aumento da expressão do RNA mensageiro para o receptor TRPA1 em gânglios da raiz dorsal de camundongos após a injeção i.pl. de CFA.....41

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- Graus centígrados
15d-PGJ <sub>2</sub>	-15-deoxi-Δ-12,14-prostaglandina J <sub>2</sub>
4-HNE	-4-hidroxinonal
ANKTM1	- Anquirina como proteína com domínios transmembrana
AS-ODN	-Antisense oligodeoxinucleotídeo
ATP	- Trifosfato de adenosina
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca <sup>+2</sup>	- Íon Cálcio
cDNA	- DNA complementar
CFA	- Adjuvante completo de Freund
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CHO	- Células de ovário de hamster chinês
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	- Desorribonucleotídeo trifosfatado
DRG	- Gânglio da raiz dorsal
GDNF	- Fator neuronal derivado de células da glia
i.c.v.	- Intracerebroventricular
i.p.	- Intraperitoneal
i.pl.	- Intraplantar
i.t.	- Intratecal
IASP	- Associação Internacional do Estudo da Dor
IB4	- Isolectina B <sub>4</sub>
m/s	- Metros por segundo
mM	- Milimolar
NGF	- Fator de crescimento neuronal
P2X <sub>3</sub>	-Receptor purinérgico subtipo 3
PAR	- Receptor ativado por protease
PBS	- Salina tampão fosfato
PGE <sub>2</sub>	- Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	- Prostaglandina I <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	-Fosfatidil inositol-4, 5 bifosfato
PKA	-Proteína quinase A
PLC	-Fosfolipase C
RNA	-Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	-Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	- Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
SNC	-Sistema nervoso central
SP	-Substância P

TRP -Receptor de potencial transitório  
TRPA - Receptor de potencial transitório anquirina  
TRPM - Receptor de potencial transitório melastatina  
TRPV - Receptor de potencial transitório vanilóide  
 $\mu\text{M}$  -Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Dor .....	1
1.1.1. Dor inflamatória.....	5
1.2. Canais iônicos de potencial transitório.....	6
1.2.1. TRPA1 um subtipo de canal iônico de potencial transitório.....	7
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. Animais.....	15
3.2. Hiperalgia inflamatória induzida pela administração i.pl. do adjuvante completo de Freund (CFA).....	15
3.3. Análise do comportamento nociceptivo evocado por estímulos de diferentes naturezas.....	16
3.3.1. Avaliação da sensibilidade da pata à estimulação mecânica.....	16
3.3.2. Avaliação da sensibilidade da pata à estimulação térmica (frio).....	16
3.4. Vias de administração.....	17
3.4.1. Administração intratecal (i.t.).....	17
3.4.2. Administração intracerebroventricular (i.c.v.).....	18
3.5. Protocolos de tratamentos.....	18
3.6. Experimentos <i>ex-vivo</i> .....	18
3.6.1. Imunohistoquímica.....	18
3.6.2. Quantificação relativa do RNAm para o receptor TRPA1 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	20
3.7. Drogas e reagentes.....	21
3.8. Análise estatística.....	22
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1. Efeito do pré- e pós-tratamento com HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgia mecânica aguda da pata de camundongos.....	23
4.2. Efeito do pós-tratamento com HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgia mecânica crônica da pata de camundongos.....	26

4.3.	Participação dos receptores TRPA1 periféricos e espinhais, mas não supraespinhais, na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA.....	28
4.4.	Efeito do pós-tratamento sistêmico com o HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgesia aguda ao frio nocivo da pata de camundongos.....	32
4.5.	Efeito da supressão do receptor TRPA1 em camundongos, sob a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	36
4.6.	Efeito do pré-tratamento sistêmico com o HC-030031 na expressão do receptor TRPA1 e na detecção do mRNA para o receptor TRPA1.....	39
5.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
6.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
7.	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>







# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Dor

De forma geral, a dor é uma condição associada a diversas patologias que pode incapacitar o indivíduo a inúmeras atividades diárias, além de gerar problemas físicos, emocionais e grandes custos à sociedade. Em virtude desses fatores limitantes, condições dolorosas distintas podem levar o indivíduo ao afastamento breve ou permanente de suas atividades diárias. Sendo assim, a dor é tratada como um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Entretanto, inúmeros estudos farmacológicos, genéticos e moleculares têm promovido um grande avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão do sinal doloroso, visando entender melhor os múltiplos fatores envolvidos neste fenômeno, bem como, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento eficazes que possam colaborar com a melhor qualidade de vida dos pacientes (Basbaum, 1999; Craig, 1999; Julius et. al. 2001)

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1994) define a dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou ainda, descritas em termos que sugerem tal dano”, sendo essa terminologia aceita até os dias atuais (Loeser e Treede 2008). Em 1975 Richard Black e Jonh D. Loeser publicaram na primeira edição da revista *Pain*, um esquema geral contendo as principais nomenclaturas e termos relacionados à nocicepção, dor, sofrimento e comportamento dolorosos, embora a existência de estruturas que detectariam tais estímulos e os transformariam em impulsos nervosos, já havia sido descrito anteriormente no começo do século por Sherrington em 1906 (Bessou e Perl 1969). A percepção da sensação dolorosa aguda é extremamente importante para a sobrevivência e a manutenção da integridade do organismo, pois essa percepção tem como propósito detectar estímulos que possam acarretar lesões. A dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também fatores emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (Basbaum *et al.* 2009). Levando em consideração esses diversos fatores, a relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da dor envolve um complexo processamento através das vias sensoriais e, a natureza

altamente subjetiva da dor, dificulta sua compreensão e tratamento clínico (Julius e Basbaum 2001).

A nocicepção (originado do latim *nocere*, que significa “ferir”) nada mais é que a detecção e o processamento de estímulos que podem vir a comprometer a integridade física do organismo como um todo. Desta forma, o calor, o frio, a pressão, a distensão, os traumas, os estímulos químicos, dentre outros, podem, direta ou indiretamente, ativar os nociceptores e causarem nocicepção (Schmidt *et al.* 1995; Basbaum *et al.* 2009). Essa detecção do sinal nocivo é realizada por terminações periféricas livres de fibras aferentes primárias denominadas nociceptores. Estas fibras sensoriais por sua vez são responsáveis por propagar o sinal nocivo da periferia para os neurônios secundários da medula espinhal. Estes, por sua vez, transmitem a informação dolorosa para centros integrados do sistema nervo centrais (SNC) através de vias ascendentes específicas (Woolf e Mannion 1999; Calvino e Grilo 2006).

Baseado em critérios anatômicos, morfológicos e neuroquímicos, as fibras aferentes primárias podem ser classificadas como fibras A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\delta$  ou C. Estas fibras sensoriais estão amplamente distribuídas pelo organismo como, por exemplo, na pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras, e apresentam características específicas no que se refere ao limiar de ativação ou à responsividade à determinados estímulos que as distinguem das outras fibras sensoriais (Millan 1999; Julius e Basbaum 2001). Ainda referente à sua classificação, propriedades como modalidade sensorial, diâmetro e velocidade de condução dessas distintas fibras sensoriais são levadas em consideração. As fibras aferentes primárias do tipo A $\alpha$  e A $\beta$ , apresentam-se como proprioceptores à estímulos mecânicos de baixo limiar, são altamente mielinizadas, calibrosas (> 10  $\mu$ m e 30-100 m/s, respectivamente), têm alta velocidade de condução do estímulo nervoso (40-120 m/s) e são especialmente numerosas na superfície da pele e mucosas. As fibras A $\delta$ , possuem diâmetro e velocidade de condução intermediários (1-5  $\mu$ m e 4-30 m/s, respectivamente) e respondem a estímulos mecânicos intensos, porém são distinguidas por seus limiares distintos a estímulos térmicos como sendo do tipo I ou do tipo II. Em comparação com as demais fibras sensoriais, as fibras C, são as únicas não mielinizadas, apresentam os menores diâmetros e velocidades de condução (0,3-1,5  $\mu$ m e 0,5-2 m/s, respectivamente), sendo ativadas por todas as modalidades de estímulos nocivos (térmico, químico e mecânico) e correspondem a 80% das fibras condutoras da informação

nociceptiva (Basbaum e Woolf 1999; Millan 1999; Stein *et al.* 2009). Entretanto as fibras do tipo C, também conhecidas como fibras polimodais, podem ainda ser subdivididas em pelo menos duas classes distintas: as peptidérgicas e as não-peptidérgicas (Hunt e Mantyh 2001). As fibras C peptidérgicas expressam peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP) e dependem da neurotrofina “fator de crescimento de nervo” (NGF) para seu desenvolvimento. Já as fibras C não-peptidérgicas são identificáveis por expressarem receptores purinérgicos excitatórios da subclasse P2X<sub>3</sub>, em suas terminações nervosas; bem como por dependerem da neurotrofina “fator de crescimento de nervo derivado de células gliais” (GDNF) para se desenvolverem (Millan 1999; Costigan e Woolf 2000; Hunt e Mantyh 2001; Kashiba *et al.* 2003). As regiões da cabeça e do corpo recebem inervação de fibras sensoriais cujo seus corpos celulares encontram-se nos gânglios trigeminais e nos gânglios da raiz dorsal (DRG), respectivamente. Ambas as estruturas são grupamentos de corpos celulares de neurônios, normalmente encapsulados por células satélites de origem glial, responsável por conduzir a informação gerada na periferia para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal, respectivamente (Besson 1999; Meyer 2008; Basbaum *et al.* 2009). Situados ao lado da coluna vertebral e dispostos bilateralmente ao longo da medula espinhal, os DRGs contêm ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos que apresentam propriedades diferentes da barreira hematoencefálica do sistema nervoso central (Olsson 1990; Costigan *et al.* 2009). De forma simplificada, a informação nociceptiva periférica é reconhecida inúmeras proteínas específicas (i.e canais iônicos e receptores) expressas nas terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias e, convertida em impulsos elétricos, sendo transmitida pelos nervos espinais ou cranianos aos neurônios de segunda ordem. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas fazem sinapses diretamente com neurônios secundários, em núcleos no tronco cerebral. Já os presentes nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o SNC através da raiz dorsal da medula espinhal, onde ocorrem as sinapses com neurônios de segunda ordem. Estas sinapses ocorrem no corno dorsal da medula espinhal na substância cinzenta, que é dividida com base na citoarquitetônica por REXED (1954) em dez lâminas, sendo a lâmina I a mais superficial, a partir da região dorsal. A maioria dos nociceptores termina nas lâminas mais

superficiais, sendo que as fibras A $\delta$  fazem sinapse com neurônios secundários presentes nas lâminas I, II e também na V, e as fibras C, principalmente, com neurônios da lâmina II, também conhecida como substância gelatinosa. É importante mencionar, ainda, que as fibras A $\beta$  terminam principalmente nas lâminas III, IV e V (Rexed 1954; Costigan e Woolf 2000; Riedel e Neeck 2001; Coutaux *et al.* 2005).

Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, projetam-se para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo, que, através de neurônios terciários, podem remeter a informação nociceptiva ao córtex cerebral (Millan 1999; Almeida *et al.* 2004). A informação nociceptiva é transmitida por vários tratos, sendo os mais importantes os espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotálâmico (Russo e Brose 1998; Millan 1999; Hunt e Mantyh 2001). Dessa maneira, a informação nociceptiva alcança as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, duração e localização do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção consciente do estímulo doloroso (Millan 1999).

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da dor, existem vias de modulação e integração descendentes da informação dolorosa. As vias descendentes mais importantes e estudadas são aquelas de caráter inibitório. Essas vias originam-se na substância cinzenta periaquedutal ventral e no núcleo magno da rafe, entre outras estruturas. Os mecanismos descendentes modulam, geralmente através de neurônios do corno dorsal, interneurônios ou neurônios de projeção, cuja modulação envolve uma série de estruturas cerebrais, e de sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podem ser citados o sistema opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, glutamatérgico, além dos canabinóides endógenos (Besson 1999; Millan 2002; Basbaum *et al.* 2009).

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, sob o ponto de vista de duração, a sensação dolorosa pode ser do tipo aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada como uma resposta normal causada por um estímulo lesivo ao tecido, com conseqüente despolarização da fibra nervosa, sendo que a sensação de dor pode desaparecer até mesmo antes do local lesionado ter sido reparado. Porém, a dor aguda não desaparecendo, ela perde seu caráter protetor e torna-se lesiva ao indivíduo, compreendendo assim a dor crônica.

A dor crônica, por sua vez, é caracterizada pela incapacidade do organismo de resolver a lesão ou pela a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença, mantendo a dor mesmo após a resolução da lesão (Loeser e Melzack 1999; Coutaux *et al.* 2005; Pflingsten 2009). Exemplos de dor crônica podem incluir a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (Ashburn e Staats 1999). Durante essas condições dolorosas, o processamento sensorial está alterado. Essa alteração é decorrente de modificações na sensibilidade dolorosa tanto de estruturas periférica como centrais. Em virtude dessas alterações sensoriais ocorre o surgimento de dois fenômenos dolorosos de grande relevância clínica: a hiperalgesia e a alodínia.

A hiperalgesia e a alodínia são manifestações clínicas comuns em condições de dor neuropática e inflamatória. Segundo o Protocolo de Kyoto da IASP para a terminologia básica da dor, a hiperalgesia é um aumento da sensibilidade dolorosa, enquanto que a alodínia seria a dor em resposta a um estímulo não nociceptivo (Loeser e Treede 2008).

### **1.1.1.Dor inflamatória**

A resposta inflamatória é iniciada tão logo a lesão tecidual acontece, bem como, após o reconhecimento do sistema imunológico de um agente estranho ao organismo ou por estruturas próprias como sendo não-próprias. O processo inflamatório se caracteriza pelo aparecimento de alguns sinais clássico da inflamação, como o rubor e o calor, decorrentes da vasodilatação local. Essa vasodilatação periférica pode ser considerada como uma tentativa do tecido de remover o agente estranho, como toxinas e bactérias, aumentando assim o influxo de células de defesa para o local lesionado. Durante essa fase também ocorre o aumento da drenagem linfática, que ajuda na remoção dos elementos estranhos e restos celulares decorrentes da lesão (Woolf e Ma 2007; Rittner *et al.* 2008). Além desses eventos celulares e vasculares, há o aparecimento de um sinal comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de estímulos não-nociceptivo, ou seja, a hiperalgesia e alodínia, repectivamente. Como mencionado anteriormente, essa alteração na sensibilidade dolorosa ocorre devido à plasticidade neuronal que pode ocorrer tanto em nível periférico quanto central (Melzack 1999; Millan 1999; Woolf e Ma 2007; Loeser e Treede 2008).

A sensibilidade ocasionada pela inflamação é devida à liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes e migratórios no local da lesão tecidual. Enquanto alguns outros mediadores atuam sensibilizando os nociceptores, ou seja, diminuindo o limiar de ativação, como faz a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prostaciclina ( $PGI_2$ ), aminas simpatomiméticas e os leucotrienos. Outros mediadores também ativam diretamente os nociceptores, como a serotonina, bradicinina, ATP e alguns metabólitos da cascata inflamatória causando imediata manifestação da dor (Latremoliere e Woolf 2009).

Esses mediadores podem sensibilizar de forma direta ou indiretamente os nociceptores, favorecendo assim o aparecimento da hiperalgesia a estímulos de diferentes naturezas. Recentemente, muito progresso têm sido alcançado sobre este fenômeno doloroso (i.e. hiperalgesia). Desta forma, o descobrimento de novos alvos farmacológicos que podem estar envolvidos nesse processo, pode ser a chave para o desenvolvimento de novas drogas e terapias. Uma família de receptores que tem recebido especial atenção na fisiologia sensorial destaca-se a família dos canais iônicos de potencial transitório (TRP).

## **1.2. Canais iônicos de potencial transitório**

A superfamília de receptores de potencial transitório (TRP) diferencia-se de outros grupos de canais de íons pela seletividade de íons, modos de ativação e função fisiológica. Baseado na sequência de aminoácidos, os membros da família TRP são classificadas em seis distintas subfamílias; TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Polistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA (Anquirina). Os membros da superfamília TRP compartilham de características comuns de seis domínios transmembrana, pequenas variações nas sequências de aminoácidos e a permeabilidade a cátions. Além disso, as regiões N- e C-terminal são voltadas para o meio intracelular e os domínios transmembrana em conjunto formam um poro entre o domínio 5 e 6, por onde ocorre o influxo intracelular de íons (Clapham 2003; Schaefer 2005; Levine e Alessandri-Haber 2007). Embora os canais apresentem similaridade estrutural e na permeabilidade a cátions, os canais TRP são altamente diferenciados uns dos outros, podendo ser ativados de modos variados como por exemplo temperatura (calor ou frio), compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luminosidade, estresse



oxidativo, ácidos e feromônios. A família TRP possui ampla distribuição tecidual, sendo que a maioria das células do organismo podem expressar ao menos um membro da família (Levine e Alessandri-Haber 2007; Watanabe *et al.* 2008). Atualmente, muitos outros TRPs têm sido descritos em gânglios da raiz dorsal; TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1. Esses canais parecem estar envolvidos na transdução sensorial e podem participar da geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, mecânicos e térmicos (Reid 2005; Patapoutian *et al.* 2009).

Estudos mostram que os membros da família TRP parecem ser ativados por temperatura, e são responsáveis pela detecção de estímulos térmicos nocivos e não nocivos, seja ele calor ou frio. Neste sentido, o estímulo térmico evocado pelo frio, parece ser muito importante em condições inflamatórias, já que a sensibilidade ao frio é extremamente aumentada nesses casos. Sendo assim, dentre os membros da família TRP, os receptores TRPM8 e TRPA1 são alvo de grande atenção da comunidade científica, já que estudos mostram suas participações na detecção de estímulos frios.

### **1.2.1. TRPA1, um subtipo de canal iônico de potencial transitório**

O receptor TRPA1 foi inicialmente nomeado como ANKTM1 e identificado como uma proteína altamente expressa na transformação oncogênica de fibroblastos humanos (Jaquemar *et al.* 1999). Posteriormente, foi reconhecido como um novo membro da família dos TRP caracterizado pela presença de um grande número repetidos de sequências de resíduos de anquirina na região do domínio N-terminal, o que confere o nome ao receptor (Story *et al.* 2003). O receptor TRPA1 possui basicamente a mesma estrutura de proteína dos outros membros da família TRP, ou seja, é uma proteína com seis domínios transmembrana, com ambas as porções amino e carboxi terminal intracelulares (Caspani e Heppenstall 2009). O gene correspondente ao receptor foi identificado no cromossomo 8 humano que codifica uma proteína de 1119 aminoácidos. Inicialmente, o papel fisiopatológico descrito para este canal seria um papel direto ou indireto na transdução de sinal e no controle do crescimento, visto que o aumento da sua expressão em células eucarióticas interferiu com o crescimento normal (Jaquemar *et al.* 1999; Patapoutian *et al.* 2009).

Estudos prévios mostraram que os receptores TRPA1 são expressos em fibras sensoriais de pequeno (fibras C) e médio (fibras A $\delta$ ) diâmetro, mas predominantemente em fibras C que co-expressam com CGRP e substância P, sugerindo assim, seu envolvimento na transmissão do sinal doloroso. Além disso, o receptor TRPA1 estão co-localizados com os canais TRPV1, um canal polimodal ativado pela capsaicina, calor, pH e modulada por substâncias inflamatórias (Caterina *et al.* 2000; Story *et al.* 2003; Kobayashi *et al.* 2005). Estudos quantitativos realizados em camundongos adultos demonstraram que o TRPA1 é expresso em 56% dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, 36% dos neurônios do gânglio do nervo trigêmeo e 28% dos neurônios do gânglio nodoso. O receptor TRPA1 é expresso também em células ciliadas que formam a membrana basilar da cóclea, propondo assim que o receptor TRPA1 poderia estar envolvido na mecanotransdução (Corey *et al.* 2004; Nagata *et al.* 2005; Levine e Alessandri-Haber 2007). Recentemente um estudo mostrou que os receptores TRPA1 poderiam também estar expressos em tecidos não-neuronal, mostrando sua expressão na pele sugerindo sua participação na regulação e diferenciação de queratinócitos (Atoyán *et al.* 2009).

O TRPA1 é diretamente ativado por compostos irritantes e pungentes de origem natural como o alil-isotiocianato (óleo de mostarda), cinamaldeído (óleo de canela), alicina (alho), tetrahydrocannabinol (maconha), gingerol (gingibre) entre outros (Calixto *et al.* 2005; Patapoutian *et al.* 2009; Schmidt *et al.* 2009). Além dos compostos de origem natural, o receptor TRPA1 pode ser ativado pela acroleína, composto presente na queima de combustíveis, fumaça de cigarro, queima de vegetação e também subprodutos da quimioterapia (Calixto *et al.* 2005; Garcia-Anoveros e Nagata 2007). Além dos compostos exógenos, o receptor TRPA1 pode ser ativado por substâncias endógenas produzidas durante estados inflamatórios e oxidativos. Como é o caso do 4-hidroxinonal (4-HNE), um aldeído produzido da peroxidação de lipídeos, que pode ser responsável pelos efeitos patológicos do stress oxidativo. O 4-HNE produzido durante a lesão tecidual, pode ativar receptores TRPA1 em neurônios nociceptivos provocando dor aguda em camundongos (Trevisani *et al.* 2007). Outra molécula endógena que também tem a capacidade de ativar os receptores TRPA1 é um metabólito da via da ciclooxigenase, o 15-deoxi- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), produzido durante o dano tecidual e a inflamação. Estudos mostraram que o 15d-PGJ<sub>2</sub> ativa diretamente o receptor TRPA1,

evocando comportamentos nociceptivo quando injetado subcutaneamente na pata de roedores (Bandell *et al.* 2004; Bautista *et al.* 2006; Stucky *et al.* 2009). Estudos posteriores mostraram ainda que o acetaldeído, substância intermediária da metabolização do etanol, também é capaz de ativar o TRPA1 causando sensações dolorosas (Bang *et al.* 2007).

Além de ser ativado por diferentes substâncias e moléculas químicas, a atividade dos receptores TRPA1 em neurônios sensoriais pode ser modulada por outros receptores, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (Clapham 2003). Recentemente, estudos demonstraram que o receptor TRPA1 pode ser sensibilizado por receptores PAR2, um receptor acoplado a proteína G, via mecanismos mediados pela ativação da fosfolipase C (PLC) e PIP<sub>2</sub> (Dai *et al.* 2007). Além disso, a ativação do receptor TRPV1 pode dessensibilizar os canais TRPA1 também via mecanismo dependente de PIP<sub>2</sub> (Akopian *et al.* 2007). Esses dados sugerem que fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios que ativam PLC e reduzem o PIP<sub>2</sub> na membrana, podem sensibilizar os receptores TRPA1. De fato, a interação entre receptores metabotrópicos e os canais iônicos TRPA1 parece ser mediada por esses segundos mensageiros, já que estudos posteriores mostraram que o receptor TRPA1 pode ser modulado também por receptores B<sub>2</sub> para bradicinina, envolvendo a via da PLC e da proteína quinase A (PKA) durante a sinalização sensorial (Wang *et al.* 2008). Após extensas análises examinando a expressão, ativação e modulação dos receptores TRPA1, foi proposto que o receptor poderia estar envolvido na detecção do frio nocivo.

Evidências mostram a participação do receptor TRPA1 como detector do frio. Usando técnicas de eletrofisiologia em células de ovário de hamster chinês (CHO) expressando TRPA1, demonstraram que temperaturas <17°C aumentam significativamente a atividade destes receptores (Story *et al.* 2003). Análises quantitativas mostraram que células expressando TRPA1 exibiram uma escala maior de temperaturas de ativação (12 - 24°C) com uma temperatura média de 17 ± 3°C. Por outro lado, células expressando TRPM8 apresentaram um limiar de ativação em temperaturas em torno de 19 - 24°C com uma temperatura média de ativação de 22 ± 1°C (Story *et al.* 2003; Story e Gereau 2006). Esses dados em conjunto, sugerem que os receptores TRPA1 e TRPM8 possuem diferentes temperaturas de ativação, sendo o receptor TRPM8 responsável pela detecção da sensação do frio, enquanto o TRPA1 seria responsável pela detecção do frio nocivo, ativado por temperaturas mais baixas (Thut *et al.*

2003; McKemy 2005). Deste modo, o receptor TRPA1 poderia estar envolvido na nocicepção evocadas pelo frio, já que temperaturas abaixo de 17°C são capazes de provocar sensações dolorosa em humanos (Caspani e Heppenstall 2009). Dois grupos de pesquisas investigaram o envolvimento do receptor TRPA1 na detecção do frio nocivo em estados inflamatórios, através do uso de camundongos com deleção gênica do receptor TRPA1, porém diferentes conclusões baseadas nos testes comportamentais foram obtidos. Um grupo de pesquisadores mostrou um déficit na sensibilidade aguda para o frio nocivo na inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA), incluindo nas respostas de retirada da pata no teste de placa fria e a aplicação de acetona (Kwan *et al.* 2006). Entretanto, Bautista e colaboradores não encontraram diferença significativa entre camundongos com deleção gênica e camundongos selvagens na hiperalgisia ao frio induzida pelo CFA (Bautista *et al.* 2006). Essa diferença encontrada nos testes comportamentais entre os grupos de pesquisas pode ser explicada pelos diferentes métodos comportamentais utilizados, bem como nos diferentes gêneros dos animais avaliados (Stucky *et al.* 2009). Entretanto, estudos em ratos mostram que a hiperalgisia ao frio induzida pela injeção intraplantar de CFA, pode ser revertida pelo tratamento com AP18, um antagonista seletivo do receptor TRPA1 (Petrus *et al.* 2007). Semelhantemente, o tratamento com antisense para o receptor TRPA1, diminui parcialmente a hiperalgisia ao frio inflamatória induzida pelo CFA (Allchorne *et al.* 2005; Obata *et al.* 2005). Além do seu papel contestado na transdução aguda do frio, o receptor TRPA1 parece contribuir para a hiperalgisia e alodínia mecânica e térmica após a inflamação tecidual ou lesão do nervo (Obata *et al.* 2005; Katsura *et al.* 2006).

Elucidar a contribuição do receptor TRPA1 na etiologia da dor espontânea e na hiperalgisia térmica e mecânica na inflamação persistente é um importante passo para a descoberta de novas terapias analgésicas. Como dito anteriormente, o receptor TRPA1 pode ser ativado por múltiplos estímulos nocivos do ambiente, bem como por moléculas endógenas produzidas por tecidos inflamados. A formalina, um pequeno aldeído reativo, induz dor quando injetada subcutaneamente em camundongos, por efeitos não específicos de dano tecidual ou inflamação. Estudos mostram que a formalina é capaz de ativar receptores TRPA1 através da ligação covalente aos resíduos de cisteína e provocar um aumento no influxo de  $Ca^{+2}$  em células CHO que expressam o receptor (Macpherson *et al.* 2007).

Células tratadas com antagonista seletivo do receptor TRPA1, o AP18, apresentaram diminuição significativa no influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular quando estimuladas com cinamaldeído, um agonista seletivo dos receptores TRPA1. Da mesma forma, outro antagonista seletivo do receptor TRPA1, o HC030031, reduziu a ativação do receptor quando estimulado com alil isotiocianato, outro agonista seletivo do TRPA1 (Eid *et al.* 2008). Corroborando com os achados *in vitro*, camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1 mostraram que o comportamento nociceptivo induzido pela formalina, foi reduzido significativamente quando comparado com animais selvagem (Macpherson *et al.* 2007).

Trabalhos mostram ainda que o receptor TRPA1 pode estar envolvido na hiperalgesia mecânica induzida em estados inflamatórios. O AP18, antagonista seletivo do receptor TRPA1, reverteu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos (Petrus *et al.* 2007). Da mesma forma e confirmando o envolvimento do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica, Eid e colaboradores, usando outro antagonista seletivo do receptor TRPA1, o HC-030031, demonstraram que o bloqueio do TRPA1 na inflamação persistente, diminui a hiperalgesia mecânica induzida por CFA intraplantar em ratos (Eid *et al.* 2008). Trabalhos demonstram ainda que o receptor TRPA1 contribui de forma importante para o desenvolvimento de hiperalgesia em modelos inflamatórios utilizando animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 (Obata *et al.* 2005; Bautista *et al.* 2006; Kwan *et al.* 2006).

Tendo em vista a controversia participação do receptor TRPA1 na detecção do frio nocivo, bem como, na hiperalgesia ao frio, estudos ainda se fazem necessário para elucidar o real papel do TRPA1 em condições dolorosas persistentes. Sendo o receptor TRPA1 um alvo farmacológico promissor para o desenvolvimento de novas drogas e terapias para condições neuropáticas e inflamatórias



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica e ao frio após a inflamação persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar a participação do receptor TRPA1 através do tratamento com antagonista seletivo do receptor, na hiperalgesia inflamatória aguda e crônica induzida pela injeção i.pl. de CFA.
- Avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 através do pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor TRPA1, no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória mecânica evocada pela injeção i.pl. de CFA.
- Investigar o efeito do tratamento com antagonista do receptor TRPA1 através de diferentes vias de administração (intraplantar, intratecal e intracerebroventricular), na hiperalgesia mecânica aguda e crônica induzida pela injeção intraplantar de CFA.
- Confirmar a participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica e ao frio induzida pela injeção i.pl. de CFA, após o tratamento com antisense contra este receptor.
- Avaliar a expressão do RNA mensageiro e a proteína do receptor TRPA1 no DRG ou na medula espinhal após a injeção i.pl. de CFA, através das técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica, respectivamente.





### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos CD1 machos (25-35 g) criados e mantidos no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia/CCB-UFSC, sob temperatura e umidade controlada ( $22\pm 2$  °C; 70 %), em ciclo claro/escuro de 12 horas e água e comida *ad libitum*. Para os experimentos *in vivo*, os animais foram previamente ambientados no laboratório pelo menos 2 horas antes dos testes comportamentais. Os animais foram mantidos e os experimentos conduzidos de acordo com orientações para cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor (Zimmermann 1986). O número de animais e os estímulos nociceptivos utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos com drogas ou manipulações genéticas. Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (262/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (processo nº PP00032).

#### 3.2. Hiperalgisia inflamatória induzida pela administração i.pl. do adjuvante completo de Freund (Barrera *et al.*)

Inicialmente, os animais foram anestesiados por inalação de oxigênio (3%) e isofluroano (2%), após completa anestesia os animais receberam injeção i.pl. de 20 µl de Adjuvante Completo de Freud (Barrera *et al.*) (*Mycobacterium tuberculosis*, inativado por calor e diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida, Sigma, St. Louis, MO. USA) na pata direita (Ferreira *et al.* 2001). Os camundongos do grupo controle receberam injeção i.pl. contendo o mesmo volume de solução salina tamponada com tampão fosfato (PBS, composição mmol/L NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10) na pata direita.

### **3.3. Análise do comportamento nociceptivo evocado por estímulos de diferentes naturezas**

#### **3.3.1. Avaliação da sensibilidade da pata à estimulação mecânica**

A análise do limiar de retirada da pata à estimulação mecânica foi realizada de acordo com a metodologia realizada por Bortalanza *et.al.* (2002) e Quintão *et.al.* (2005), com algumas modificações. Para tal, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente individuais (9 X 7 X 11 cm), localizados sob uma plataforma elevada de arame afim de permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras, bem como sua fácil visualização. Inicialmente os animais foram avaliados quanto às medidas basais à estimulação mecânica, sendo realizada antes da injeção i.pl. de qualquer agente. Os animais que apresentaram porcentagem de retirada da pata maior que 30%, foram automaticamente excluídos do experimento. Após a verificação do limiar basal, os animais receberam injeção i.pl. de CFA ou salina, e após diferentes intervalos de tempo (1, 7, 14 e 28 dias) os animais foram submetidos ao teste comportamental. Todos os animais foram aclimatados por pelo menos 30 minutos antes do teste no aparato comportamental. A frequência de resposta de retirada da pata à estimulação mecânica foi obtida através de 10 aplicações (duração de 3-5 s cada) do filamento de von Frey de 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Os estímulos foram realizados perpendicularmente à superfície plantar da pata traseira direita do animal. Através de experimentos preliminares e trabalhos de nosso grupo, o filamento de von Frey (0,6 g), foi selecionado pois permite verificar aumento significativo na sensibilidade da pata (Bortalanza *et al.* 2002; Quintao *et al.* 2005; Manjavachi *et al.* 2009). Valores basais à estimulação mecânica produz em média 15-25 % de frequência de retirada da pata. O aumento significativo da frequência de retirada da pata a estimulação mecânica em relação ao grupo controle (salina), caracteriza o surgimento de hiperalgesia mecânica.

#### **3.3.2. Avaliação da sensibilidade da pata à estimulação térmica (frio)**

Para verificar a sensibilidade da pata à estimulação térmica ao frio, utilizou-se a metodologia previamente descrita por Chichorro *et. al.*

(2006) com pequenas modificações. Para tal, os animais foram colocados individualmente dentro de funis de vidro transparente com 20 cm de diâmetro e posterior a estes, espelhos foram posicionados a fim de melhor visualizar a pata traseira do animal durante todo o tempo do experimento. Em diferentes intervalos tempo (1, 7, 14 e 28 dias) após a injeção i.pl. de CFA ou salina, foi analisado o comportamento nociceptivo evocado pela estimulação ao frio nocivo através de um spray de tetrafluoroetano. Para isto, os animais foram imobilizados com ajuda de um cone de papel, de forma que os mesmos permaneciam dentro do cone, e somente as patas traseiras ficavam expostas. Imediatamente após a imobilização foi aplicado na superfície ventral da pata dos animais o spray de tetrafluoroetano durante aproximadamente 1s. Em seguida, os animais foram colocados dentro dos funis e o comportamento nociceptivo causado (lambida da pata) foi registrado com o auxílio de um cronômetro durante o período de 5 minutos. É importante ainda, salientar que antes dos testes comportamentais os animais foram aclimatados por pelo menos 30 minutos antes da estimulação ao frio. O aumento no tempo de reação (lambida, mordida da pata) após a aplicação do spray, caracterizou o surgimento de hiperalgesia térmica ao frio. Adicionalmente ao comportamento nociceptivo registrado, verificamos o tempo de latência para o início do primeiro evento nociceptivo após a aplicação do spray. Reduções significativas do tempo de latência após a estimulação da pata ao frio nocivo em relação ao grupo controle (salina), também foi usado como indicativo de hiperalgesia térmica ao frio.

### **3.4. Vias de administração**

#### **3.4.1. Administração intratecal (i.t.)**

A administração do antagonista seletivo (HC-030031) e do oligonucleotídeo anti-sentido contra o receptor TRPA1 foi realizada de acordo com o método padronizado anteriormente (Hylden e Wilcox 1980) com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25 µl), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L5-L6. O volume administrado pela via i.t. dos diferentes agentes foi de 5 µl.

### **3.4.2. Administração intracerebroventricular (i.c.v.)**

A administração do antagonista seletivo do receptor TRPA1 (HC-030031) foi realizada de acordo com o método descrito por (Laursen e Belknap 1986). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O<sub>2</sub>, durante 3 min) e uma agulha (30 G; 4,2 mm de comprimento) foi conectada a uma microseringa (25 µl) e esta a uma cânula de polietileno foi inserida diretamente no ventrículo lateral (coordenadas do bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; 3 mm vertical). O volume administrado pela via i.c.v. do HC-030031 foi de 5 µl.

### **3.5. Protocolos de tratamento**

A hiperalgesia mecânica foi avaliada 24 horas para o pós tratamento e 1 hora para o pré tratamento após a injeção i.pl. de CFA e os animais receberam os seguintes tratamentos farmacológicos.

- HC-030031, antagonista seletivo dos receptores TRPA1, dissolvidos inicialmente em uma solução de DMSO (90%) e Tween<sup>®</sup> 80 (10%). Após completa dissolução, foi adicionado salina de maneira que a solução se apresentasse em uma concentração final de 10 % de DMSO.
- AS-ODN (5 µl), oligonucleotídeo contra o receptor TRPA1, suspenso em tampão fosfato livre de nuclease.
- Os animais controle foram igualmente tratados com solução salina ou salina tamponada com fosfato (PBS) nos testes correspondentes.

### **3.6. Experimentos *ex-vivo***

#### **3.6.1. Imunohistoquímica**

A análise imunohistoquímica foi realizada na medula espinhal de camundongos 24 horas após a injeção i.pl. de CFA e 2 horas após o tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, o HC-030031 (300 mg/kg, i.p.). O esquema de tratamento dos animais e a coleta das amostras de medula espinhal dos mesmos, foi realizado conforme experimentos prévios. Para tal, as medulas dos animais foram coletadas após processo de perfusão com PBS e paraformaldeído 4%, sendo mantidas nessa mesma solução durante 24 h. Posteriormente, o tecido correspondente a região L1 e L5 da

medula espinhal foi seccionado para obtenção de cortes transversais. As amostras foram submetidas ao processamento histológico padrão para a inclusão do tecido em parafina. Os cortes teciduais de espessura de 3–4  $\mu\text{m}$  foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de 3-amino-propil-trietoxisilano; (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Em seguida, as lâminas contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 h, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos mesmos. Após fixação, as secções histológicas foram desparafinizadas através de imersões consecutivas em xilol e reidratadas por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v), durante 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 35 min, em banho-Maria ajustado para 95–98°C. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-Maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada e PBS.

A imunodeteção do receptor TRPA1 foi realizada utilizando um anticorpo anti-TRPA1 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluído em líquido diluente para anticorpos (Novocastra<sup>®</sup>; Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–16 h, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado apropriado (1:250; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) em câmara úmida durante 50 min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e a detecção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (1:250; Dako Cytomation). Após 30 min de incubação das lâminas em câmara úmida com a solução de

streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as mesmas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) (DAB, Sigma-Aldrich) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Merck).

Posteriormente, foi realizada contracoloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, no qual o corte histológico foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário). Os resultados foram documentados utilizando uma câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Para análise da reação antígeno-anticorpo, foram obtidas quatro imagens a partir do corte histológico da medula dos camundongos, sendo uma imagem para cada sub-região da medula. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcagem (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a análise dos níveis de TRPA1, a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como unidades arbitrárias.

### **3.6.2. Quantificação relativa do RNAm para o receptor TRPA1 através da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.**

Seguindo este protocolo experimental verificamos o possível do efeito do tratamento com HC-030031 (300 mg/kg; i.p.) 24 h e 2 h antes da injeção i.pl. de CFA sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para o receptor TRPA1 nos gânglios da raiz dorsal (GRD). Para tal, os GRD da região lombar (L1-L5) foram coletados bilateralmente e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada. Os dez GRDs coletados foram homogeneizados em solução de TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para extração do RNA total. Posteriormente, homogeneizados com auxílio de um poter e adicionados 100 µl de clorofórmio ao homogeneizado, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4°C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 µl de isopropanol. O

conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 min, 4°C), sendo o sedimento resultante ressuspensionado em 500 µl de etanol gelado. Após centrifugação (7.000 x g, 5 min, 4°C), o sedimento contendo o RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), sendo que sua concentração e pureza foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm.

As amostras contendo 2 µg de RNA total foram incubadas em um volume final de 12,5 µl de reação em presença de 0,05 µg de oligo dT, 2U de inibidor de RNase, dNTPs (144 µM), 50 U de transcriptase reversa (M-MLV) e água-DEPC para completar o volume, todos da Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil). Antes da adição da enzima, os tubos foram aquecidos por 5 min a 70°C, resfriados à 4°C por 5 min e incubados à 25°C durante a adição da transcriptase reversa. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 min, 70°C por 5 min e resfriadas à 4°C por 5 min. Dos 12,5 µl da reação de cDNA, 1 µl foi utilizado para cada reação de PCR em Tempo Real. As reações foram realizadas utilizando-se da química TaqMan, que consistiu do TaqMan PCR Master Mix e sondas para TRPA1 (código Mm00435175\_m1) todos da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), em um volume final de reação de 10 µL, conforme orientações do fabricante.

### 3.7. Drogas e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas: Adjuvante Completo de Freund (CFA, 1 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis inativado pelo calor em 85% de óleo de parafina e 15% manidemonoleate) da Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.. Tetrafluoroetano foi adquirido da Aerojat Ltda, RJ, Brasil. O HC-030031 [2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purina-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida], APCI m/z [M + H] + 356,2, foi sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina como descrito pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (Lerner 2008) e seu grau de pureza foi superior a 98%. O antisense (AS-ODN, da sequência do DNA 5'-TCTATGCGTTATGTTGG-3', GenBank sob o número NM\_207608) contra o RNAm do receptor TRPA1 foi adquirido da Invitrogen Ltda, Carlsbad, CA, E.U.A.. Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico e foram obtidos a partir de fornecedores de padrão comercial. O HC-030031 foi dissolvido em

10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 5% de Tween® 80 e 85% de solução salina estéril. A solução de HC-030031 injetado por via i.pl., i.t. ou i.c.v., possuía 10% de DMSO. AS-ODN foi suspenso em tampão fosfato livre de nuclease.

### **3.8. Análise estatística**

Os resultados foram expressos com a média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Bonferroni quando apropriado. As porcentagens de inibições estão apresentadas como a média  $\pm$  erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual. Valores de  $P$  menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativo de significância.

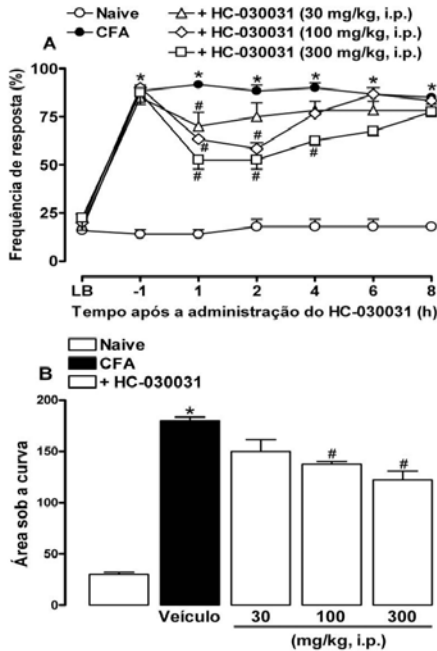


## 4. RESULTADOS

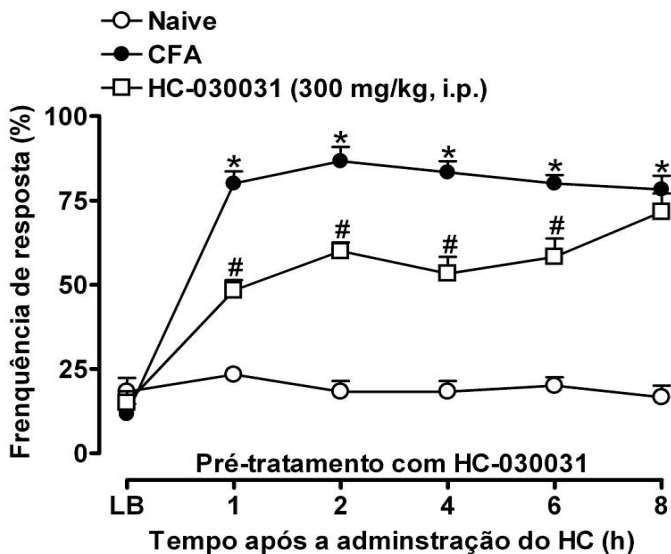
### 4.1. Efeito do pré- e pós-tratamento com HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgesia mecânica aguda da pata de camundongos

Inicialmente, na tentativa de ampliar a visão e confirmar o envolvimento do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CFA, os animais foram pós-tratados sistemicamente com diferentes doses do HC-030031 (30-300 mg/kg, i.p.), um antagonista seletivo do receptor TRPA1. Como ilustra a Figura 1, a sensibilidade da pata à estimulação mecânica foi significativamente aumentada 24 h após a administração i.pl. de CFA quando comparado ao grupo controle que recebeu somente salina i.pl. O tratamento com HC-030031 inibiu de forma parcial, mas significativamente, a hiperalgesia mecânica aguda induzida pelo CFA. A inibição foi de maneira dose e tempo dependente quando comparado ao grupo que recebeu veículo. A análise do decurso temporal do efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031, na sua maior dose, nos revela que este efeito perdurou por até 4 h e retornou aos valores basal na oitava hora após sua administração. Sendo que a inibição máxima atingida após o tratamento com HC-030031 (300 mg/kg) foi de  $51 \pm 7\%$  (Figura 1A). Baseados nesses resultados, selecionamos a dose de 300 mg/kg do HC-030031 para experimentos posteriores. A Figura 1B demonstra o efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031 (30-300 mg/kg) sobre a hiperalgesia mecânica aguda com base na área sob a curva (0 - 8 h) após a injeção i.pl. de CFA.

Visto que o pós-tratamento com o antagonista seletivo do receptor TRPA1 reduziu a hipersensibilidade à estimulação mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA, em seguida verificamos a capacidade do pré-tratamento com HC-030031 em prevenir o aumento da sensibilidade da pata à estimulação mecânica. Para isso, os animais foram pré-tratados com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) 1 h antes da indução da hiperalgesia inflamatória aguda e o comportamento nociceptivo à estimulação mecânica foi observado por um período de até 8 h. Como demonstrado na Figura 2, o pré-tratamento com HC-030031 preveniu significativamente a hiperalgesia mecânica aguda da pata até a sexta hora após sua administração, quando comparado ao grupo que recebeu veículo.



**Figura 1: Efeito do pós-tratamento sistêmico com o antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1. (A)** Curva dose-resposta representando o efeito do pós-tratamento com o HC-030031 (30, 100 e 300 mg/kg, i.p.), sobre a hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA (20  $\mu$ l/pata), 24 horas após o estímulo flogístico. **(B)** Efeito do tratamento com HC-030031 sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA expresso como base na área sob a curva (0 – 8 h). Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos denotam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo salina i.pl. e # $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA i.pl. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni. LB, Limiar basal à estimulação mecânica.



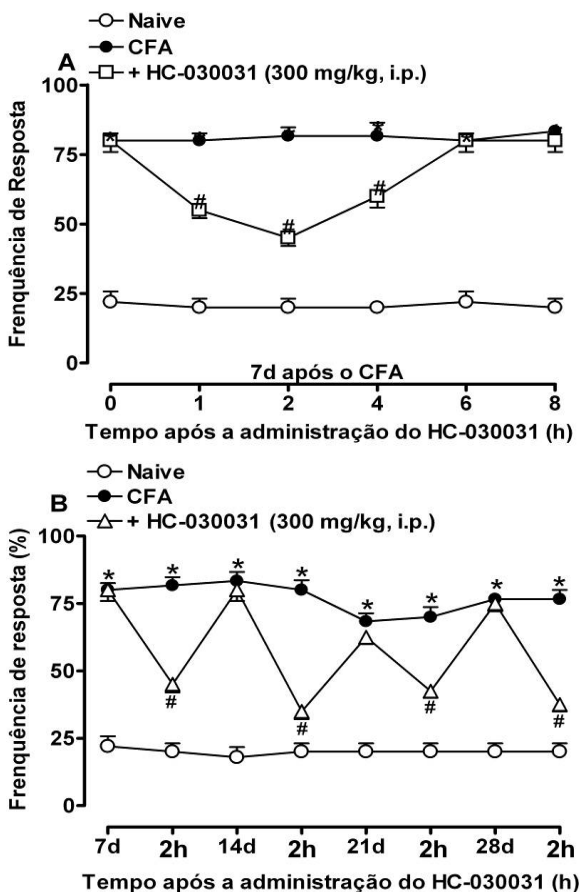
**Figura 2: Efeito do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.** O gráfico representa o efeito do pré-tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.), sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA (20  $\mu$ l/pata). Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo salina i.pl. e # $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA i.pl. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni. LB, Limiar de retirada basal.

#### **4.2. Efeito do pós-tratamento com HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgesia mecânica crônica da pata de camundongos**

Com base nos resultados apresentados anteriormente, que sugerem o envolvimento do receptor TRPA1 na gênese e na manutenção da hiperalgesia mecânica aguda induzida por CFA, levantou-se a hipótese se o tratamento com o HC-030031 também seria capaz de reverter a hiperalgesia mecânica persistente da pata evocada por este mesmo agente inflamatório. Para confirmar nossa hipótese, os animais foram tratados com o HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias após a injeção i.pl. de CFA.

De forma similar aos resultados obtidos com os tratamentos na hiperalgesia mecânica aguda com o HC-030031, o tratamento terapêutico com o antagonista do receptor TRPA1 também reduziu de forma significativa a hiperalgesia mecânica crônica induzida por CFA (Figura 3). Quando comparamos o efeito do tratamento com HC-030031 sobre a hiperalgesia mecânica aguda (1<sup>o</sup> dia, Figura 1A) e crônica (7<sup>o</sup> dia), verificou-se que o efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031 em ambas as condições dolorosas foram semelhantes (Figura 3A). O efeito antinociceptivo do tratamento com o HC-030031 perdurou por até a 4<sup>o</sup> h após o tratamento e apresentou uma porcentagem de inibição máxima de  $59 \pm 5$  %.

Uma vez caracterizado o perfil farmacológico do efeito anti-hiperalgésico do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, os animais foram tratados com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) em diferentes intervalos de tempo (14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias após a injeção i.pl. de CFA). Nestes intervalos, o efeito antinociceptivo foi avaliado sempre na 2<sup>o</sup> hora após a administração do antagonista. Neste sentido, os resultados da Figura 3B demonstram que o tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) reverteu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica apresentando inibições de  $75 \pm 5$ ,  $63 \pm 4$  e  $71 \pm 4$  %, respectivamente.



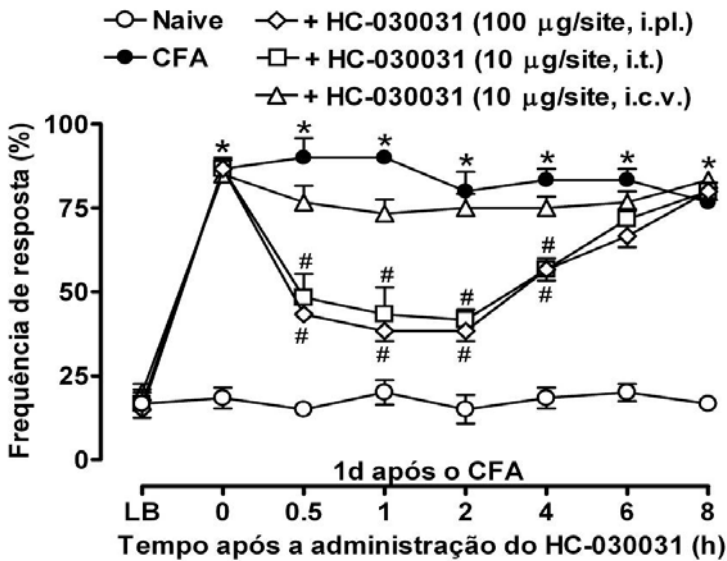
**Figura 3:** Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sob a hiperalgesia mecânica crônica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1. (A) Efeito do pós-tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.), sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de CFA (20  $\mu$ l/pata), 7 dias após o estímulo flogístico. (B) Efeito do pós-tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.), na hiperalgesia mecânica crônica induzida por CFA (20 $\mu$ l/pata), por um período total de até 28 dias, avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28 após a indução da hiperalgesia. Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos denotam a diferença significativa: \* $p$ <0,05 quando comparado com o grupo salina i.pl. e <sup>#</sup> $p$ <0,05 comparando com o grupo CFA i.pl. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.

### **4.3. Participação dos receptores TRPA1 periféricos e espinhais, mas não supraespinhais, na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA**

Baseado em nossos resultados, onde demonstrou-se o envolvimento do receptor TRPA1 na gênese e na manutenção da hiperalgesia mecânica aguda e crônica induzida pelo CFA, levantou-se à hipótese se o efeito antinociceptivo do tratamento sistêmico com o HC-030031 seria associado com sua habilidade em bloquear os receptores TRPA1 localizados tanto ao nível periférico quanto central. Para respondermos essa hipótese, os animais foram tratados com o antagonista do receptor TRPA1, HC-030031, através de diferentes vias de administração (i.pl., i.t. ou i.c.v.) em distintos intervalos de tempo (1°, 7°, 14°, 21° e 28° dia) após a injeção i.pl. de CFA. O tratamento com o HC-030031 inibiu de forma parcial, porém significativamente a hiperalgesia mecânica causada pelo CFA (1° dia), quando os animais foram tratados pelas vias i.pl. (100 µg/sítio) e i.t. (10 µg/sítio), com porcentagens de inibição de  $67 \pm 5$  e  $62 \pm 5$  %, respectivamente. Diferentemente, o tratamento i.c.v. com HC-030031 (10 µg/sítio) não alterou de maneira significativa a hiperalgesia mecânica da pata causada pelo CFA (Figura 4).

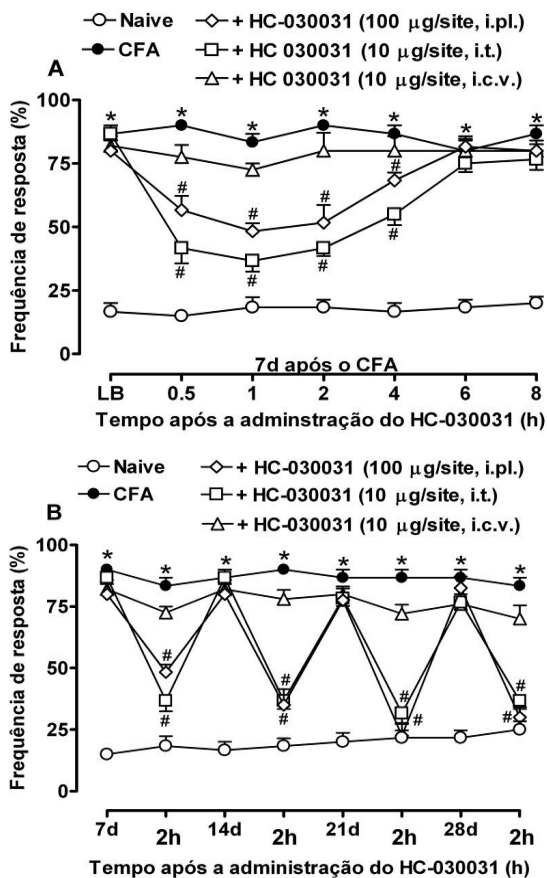
Seguindo o mesmo protocolo experimental verificamos o efeito do tratamento com HC-030031 no 7° dia após a indução da hiperalgesia mecânica. De maneira similar aos achados da hiperalgesia mecânica aguda somente o tratamento periférico (i.pl.) e espinhal (i.t.) com HC-030031 reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica tardia, apresentando porcentagens de inibições de  $67 \pm 5$  e  $71 \pm 6$  %, respectivamente. Já o tratamento i.c.v. com HC-030031 não alterou de forma significativa a hipersensibilidade mecânica tardia causada pelo CFA (Figura 5A). De forma similar aos resultados obtidos no 7° dia após o estímulo inflamatório, o HC-030031 reverteu de forma significativa a hiperalgesia mecânica crônica da pata dos animais. A administração i.pl. ou i.t. apresentou diminuição da hipersensibilidade mecânica crônica, apresentando pico de inibição expressos em porcentagens de  $76 \pm 9$  e  $74 \pm 5$  % para o 14° dia,  $92 \pm 4$  e  $82 \pm 6$  % para o 21° dia e  $86 \pm 6$  e  $76 \pm 5$  % para o 28° dia, respectivamente. Novamente como nas avaliações anteriores, o tratamento i.c.v. não apresentou alteração significativa na hiperalgesia mecânica crônica em nenhum dos intervalos avaliados (Figura 5B).

De acordo com os resultados descritos acima, nossos achados fortemente sugerem que o efeito anti-hiperalgésico do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, decorre da sua capacidade em bloquear os receptores localizados em terminações nervosas periféricas e espinhais.



**Figura 4:** Efeito do tratamento periférico ou central com o antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sobre a hiperalgesia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1. Efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031, 24 horas após a injeção i.pl. de CFA, por diferentes vias de administração: intraplantar (100 µg/sítio, i.pl.), intratecal (10 µg/sítio, i.t.) ou intracerebroventricular (10 µg/sítio, i.c.v.), sobre a hiperalgesia mecânica aguda. Cada grupo representa a média ± E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle que recebeu injeção i.pl. de salina e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que recebeu injeção i.pl. de CFA. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni. LB, Limiar de retirada basal.





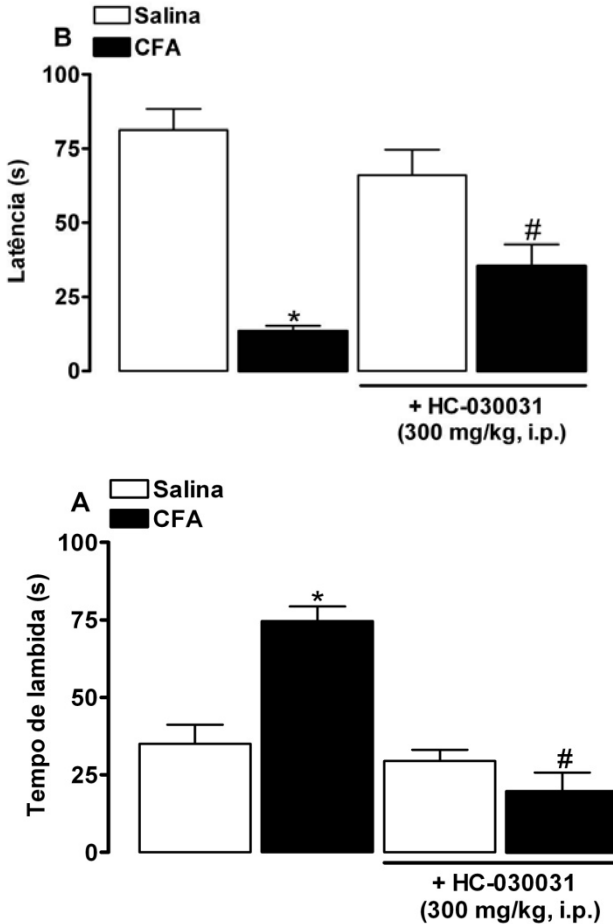
**Figura 5: Efeito do tratamento periférico ou central com o antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sobre a hiperalgesia mecânica tardia induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.(B)** Efeito antinociceptivo do tratamento com HC-030031 por diferentes vias de administração: intraplantar (100 µg/sítio, i.pl.), intratecal (10 µg/sítio, i.t.) ou intracerebroventricular (10 µg/sítio, i.c.v.), no 7º dia após a injeção i.pl. de CFA. Cada grupo representa a média ± E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle que recebeu injeção i.pl. de salina e # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo que recebeu injeção i.pl. de CFA. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni. LB, Limiar de retirada basal.

#### **4.4. Efeito do pós-tratamento sistêmico com o HC-030031, um antagonista seletivo do receptor TRPA1, sobre a hiperalgesia aguda ao frio nocivo da pata de camundongos**

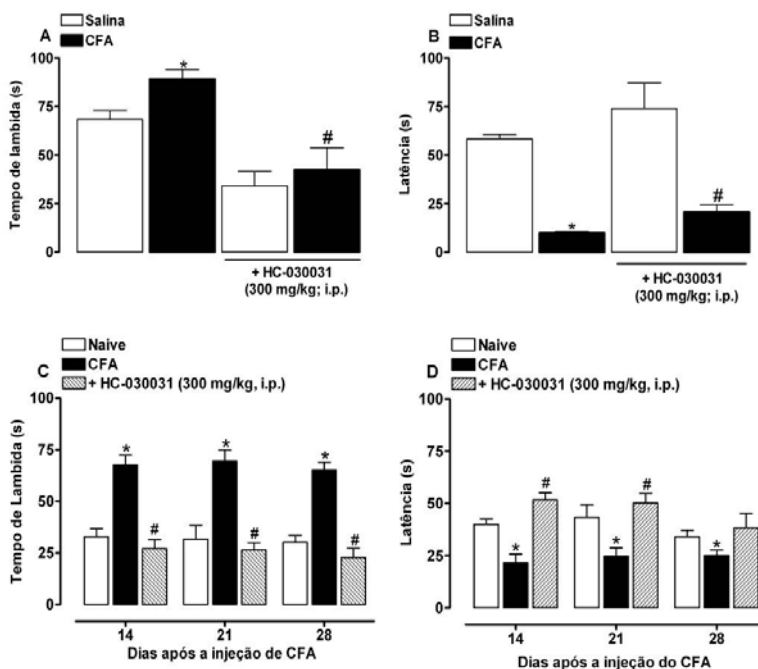
Com base nos resultados obtidos da hiperalgesia mecânica e levando em consideração os divergentes achados na literatura sobre a importância do receptor TRPA1 na detecção do frio nocivo (Bautista *et al.* 2006; Trevisani *et al.* 2007), analisamos a seguir a possível participação deste receptor na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela injeção i.pl. de CFA. Os animais foram pós-tratados sistemicamente com o antagonista seletivo de receptor TRPA1, o HC-030031 (300 mg/kg, i.p.), e como mostrado na figura 6, a sensibilidade da pata à estimulação ao frio nocivo, foi significativamente aumentada 24 h após a administração i.pl. de CFA quando comparado ao grupo que recebeu somente PBS. O tratamento sistêmico com o HC-030031 inibiu de maneira parcial, porém significativa, a hiperalgesia térmica ao frio induzida pelo CFA, com base na redução do tempo de lambida na pata estimulada por um período total de 5 minutos (Figura 6A), e também o tempo de latência para a primeira lambida (Figura 6B). As duas avaliações foram comparadas ao grupo controle que recebeu somente veículo.

Levando em consideração nossos achados anteriores, onde o pós-tratamento com o HC-030031 diminuiu a sensibilidade da pata dos animais na hiperalgesia térmica aguda, analisamos a seguir se o receptor TRPA1 estaria envolvido no processo crônico da hiperalgesia térmica ao frio induzido pelo processo inflamatório. Para isso, os animais foram tratados com o HC-030031 (300 mg/kg i.p.) no 7°, 14°, 21° e 28° dia após a injeção i.pl. de CFA. De forma similar aos resultados obtidos na hiperalgesia ao frio aguda, a injeção i.pl de CFA aumentou a sensibilidade da pata à estimulação térmica ao frio, quando avaliados no 7°, 14°, 21° e 28° dias após sua injeção. Confirmando nossa hipótese, o tratamento com o antagonista de receptor TRPA1, reduziu a hiperalgesia térmica crônica ao frio induzida pelo CFA. (Figura 7). Analisando o efeito do HC-030031 sobre a hiperalgesia térmica aguda (1° dia) e crônica (7° dia), verificamos que o efeito do HC-030031 em ambas as condições foram semelhantes, diminuindo o tempo total de lambidas (Figura 7A), bem como o aumento da latência para a lambida (Figura 7B). O tratamento com o HC-030031 realizado no 14°, 21° e 28° dias após a injeção de CFA, também foi capaz de diminuir a hiperalgesia térmica ao frio frente ao estímulo com tetrafluoroetano, tanto quando

analisado no tempo total de lambidas (Figura 7C), bem como no tempo para a latência da lambida (Figura 7D).



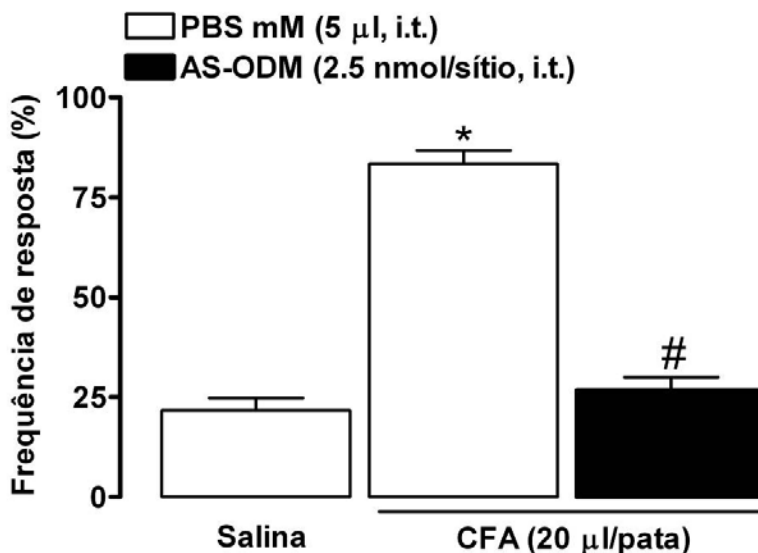
**Figura 6: Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, sob a hiperalgesia térmicas aguda ao frio nocivo induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1. (A)** Influência do pós-tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) na hiperalgesia térmica ao frio na contagem total do tempo em que o animal lambe a pata, por um intervalo de 5 minutos e **(B)** a latência para a lambida induzida por CFA e estimulada com tetrafluoroetano Cada grupo representa a médias  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo i.pl. (Salina) e # $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA i.pl. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.



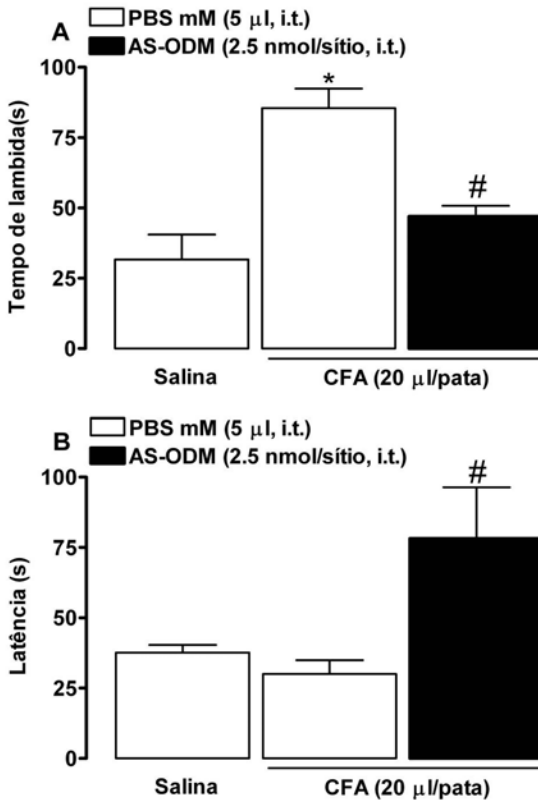
**Figura 7: Efeito do pós-tratamento sistêmico com antagonista seletivo de receptor TRPA1, HC-030031, na hiperalgesia térmica crônica ao frio, induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos CD1.** Efeito do tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p) sobre a hiperalgesia térmica crônica, 7 dias após a injeção de CFA (20  $\mu$ l/pata), analisando o número de lambidas da pata estimulada (A) e a latência para a lambida (B). Efeito do tratamento com HC-030031 (300 mg/kg, i.p) sobre a hiperalgesia térmica crônica, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias após a injeção de CFA (20  $\mu$ l/pata), analisando o número de lambidas da pata estimulada (C) e a latência para a lambida (D) Cada grupo representa a médias  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p$ <0,05 quando comparado com o grupo veículo i.pl. (Salina) e #  $p$ <0,05 comparando com o grupo CFA i.pl. Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.

#### **4.5. Efeito da supressão do receptor TRPA1 em camundongos, sob a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção i.pl. de CFA**

Em conjunto, os achados farmacológicos até aqui apresentados demonstram claramente que os receptores TRPA1 expressos tanto a nível periférico quanto central desempenham um papel crucial na hiperalgesia mecânica aguda e crônica. A fim de ampliar e confirmar os resultados farmacológicos fez-se uso de uma estratégia molecular para a supressão gênica do receptor TRPA1, através do tratamento i.t. repetido com antisense (AS-ODN) contra o TRPA1. O tratamento com antisense (AS-ODN) contra o receptor TRPA1, bloqueou significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA (1<sup>o</sup> dia), quando comparado aos animais que receberam PBS pela mesma via de administração. A porcentagem de inibição atingida pela supressão molecular do receptor TRPA1 foi de  $89 \pm 5\%$  (Figura 8). Semelhantes aos resultados obtidos na hiperalgesia mecânica, o tratamento intratecal com antisense contra o receptor TRPA1 reduziu a hiperalgesia ao frio nocivo (Figura 9A). Além disso, também reduziu outro parâmetro observado e relacionado ao fenômeno hiperalgésico térmico (ao frio), a latência de resposta para o primeiro evento nociceptivo (lamber da pata) (Figura 9B).



**Figura 8: Efeito da administração i.t. do antisense contra o receptor TRPA1 (TRPA1 AS-ODN) na hiperalgesia mecânica induzida por CFA.** Efeito da supressão do gene para o receptor TRPA1, após o tratamento i.t. do TRPA1 AS-ODN, sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA (20 µl/pata) em camundongos CD1. Cada grupo representa a médias ± E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo i.pl. (Salina) e #  $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA (sem antisense). Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.



**Figura 9:** Efeito da administração do antisense TRPA1 (TRPA1 AS-ODN) sobre a hiperalgesia térmica ao frio induzida por CFA. Efeito da supressão do gene TRPA1 sob a hiperalgesia térmica avaliada pela resposta no tempo de lambida da pata estimulada com tetrafluoroetano (**A**) e a latência para o comportamento de lamber (**B**). Cada grupo representa a médias  $\pm$  E.P.M de 6 animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo i.pl. (Salina) e #  $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA (sem antisense). Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.



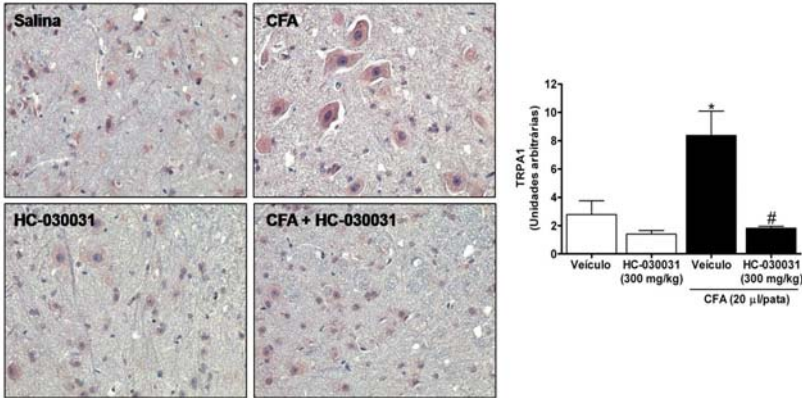
#### **4.6. Efeito do pré-tratamento sistêmico com o HC-030031 na expressão do receptor TRPA1 e na detecção do mRNA para o receptor TRPA1**

Para verificar se o pré-tratamento sistêmico com HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) seria capaz de impedir o aumento da expressão dos receptores TRPA1 induzida pela injeção i.pl. de CFA, avaliou-se os níveis protéicos deste receptor na medula espinhal através de imunohistoquímica.

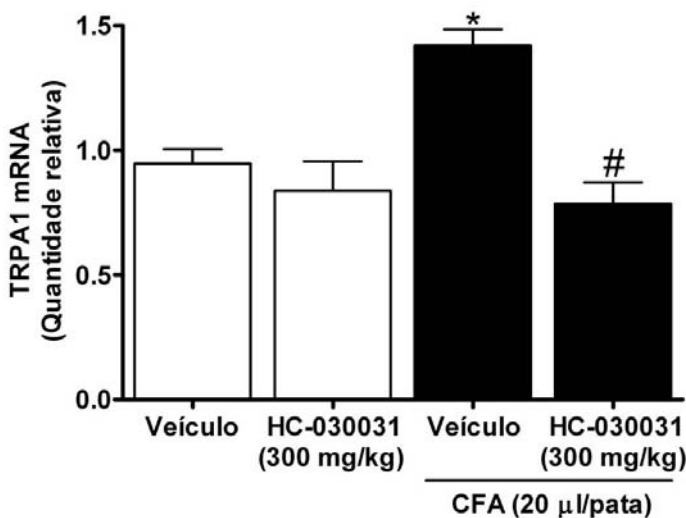
A análise de amostras da medula espinhal (L1-L5) do lado ipsilateral da pata injetada (CFA ou PBS) demonstra a expressão de níveis basais de proteínas para o receptor TRPA1. No entanto, comparado às amostras dos animais do grupo controle (PBS), as imunomarcações da medula espinhal referentes aos animais que receberam injeção i.pl. de CFA apresentaram um aumento significativo na expressão da proteína para o receptor TRPA1. Porém, quando os animais foram sistemicamente pré-tratados com o antagonista HC-030031, ocorreu uma inibição significativa da expressão dos receptores TRPA1 na medula espinhal (Figura 10).

Com base nos resultados apresentados acima, que demonstraram que o pré-tratamento com HC-030031 diminuiu os níveis de expressão do receptor TRPA1 na medula espinhal, tornou-se importante uma análise mais refinada sobre o padrão de expressão do RNAm para o receptor TRPA1 no gânglio da raiz dorsal (GRD). De forma similar aos achados da expressão do receptor TRPA1, a quantificação do mRNA para este receptor apresentou-se aumentada quando avaliado 24 horas após os animais receberem a injeção i.pl. de CFA. No entanto, quando os animais foram pré-tratados com o antagonista HC-030031 (300 mg/kg, i.p.), ocorreu uma redução significativa dos níveis do RNAm para o receptor TRPA1 nos GRD (Figura 11).

A



**Figura 10:** A superexpressão do receptor TRPA1 na medula espinal em camundongos tratados subcutaneamente com CFA intraplantar. Efeito do pré-tratamento sistêmico com antagonista de receptor TRPA1, o HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) sobre a expressão do receptor TRPA1, na medula espinal (L1-L5) de camundongos CD1 24 h após a injeção i.pl. de CFA (20µl/pata) (A) Imagens histológicas representativa da reação de imunohistoquímica para a proteína TRPA1 na medula espinal. (B) Medida da densidade óptica da imunorreatividade média para os receptores TRPA1 na medula espinal. Cada grupo representa a médias  $\pm$  E.P.M de três animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veiculo e #  $p < 0,05$  para o grupo CFA (sem HC-030031). Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.



**Figura 11:** A superexpressão mRNA TRPA1 em gânglios da raiz dorsal em camundongos tratados subcutaneamente com CFA intraplantar. Efeito do pré-tratamento sistêmico com antagonista de receptor TRPA1, o HC-030031 (300 mg/kg, i.p.) sobre a expressão do receptor TRPA1, nos gânglios da raiz dorsal (L1-L5) em camundongos CD1, 24 h após a injeção i.p. de CFA (20 µl/pata). A quantidade relativa da transcrição do gene TRPA1 foi determinada por Taqman qPCR 27 cDNA. Cada grupo representa a médias ± E.P.M de três animais. Os símbolos representam a diferença significativa: \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo veículo e #  $p < 0,05$  comparando com o grupo CFA (sem HC-030031). Análise de variância de uma via/ANOVA (medidas repetidas) seguido do teste de Bonferroni.



## 5. DISCUSSÃO

Desde a descoberta e a caracterização dos receptores TRPA1, grande parte dos estudos envolvendo estes receptores foi concentrado na participação da transmissão do sinal doloroso. Deste modo, inúmeros estudos mostram por diferentes modelos comportamentais e técnicas a participação do TRPA1 em condições de dor inflamatória e neuropática. Contudo, apesar das muitas evidências mostrarem a participação do receptor TRPA1 na detecção de estímulos térmicos e mecânicos, ainda se faz necessária uma melhor elucidação dos mecanismos operados por este receptor. Neste sentido, o conjunto de resultados apresentados no presente trabalho contribui para elucidar e avançar nos conhecimentos acerca do envolvimento do receptor TRPA1 na hiperalgesia mecânica e térmica (i.e. frio nocivo) em condição inflamatória aguda e crônica. Para tal foram utilizados bloqueio farmacológico dos receptores através do uso de antagonista seletivo, bem como a supressão do gene pelo tratamento com antisense contra o receptor TRPA1 que confirmam a redução da hiperalgesia inflamatória térmica e mecânica. Além disso, verificamos que o bloqueio do receptor TRPA1 pelo seu antagonista, o HC-030031, diminui também sua expressão tanto central quando periféricamente.

Dados da literatura mostram que a injeção i.pl. de CFA produz resposta inflamatória e por consequência, dor inflamatória, a qual se desenvolve rapidamente e perdura por vários dias. De fato, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a injeção i.pl. de CFA provoca hiperalgesia persistente (Ferreira *et al.* 2001; Quintao *et al.* 2005; Paszcuk *et al.* 2007; Manjavachi *et al.* 2009). Este efeito está associado a mudanças marcantes na transmissão da informação nociceptiva de neurônios periféricos e centrais. A sensibilização periférica pode estar associada a lesões, inflamação ou doenças como a diabetes, artrite ou crescimento tumoral. Essa sensibilização resulta de alterações das propriedades de nervos periféricos que ocorre em consequência de danos teciduais, ou ainda, devido a mudanças eletrofisiológicas das fibras periféricas primárias o que possibilita o surgimento de disparos neuronais ectópicos e a condições de hipersensibilidade. De fato, o uso de anestésicos locais e sistêmicos para o tratamento de diferentes condições neuropáticas e inflamatórias parece ser mediado pelo bloqueio de canais de sódio que se acumulam em fibras sensoriais periféricas (Basbaum e Woolf

1999; Basbaum *et al.* 2009). Por outro lado, a sensibilização pode ocorrer de forma dependente da plasticidade sináptica comum em estados inflamatórios e neuropáticos. A atividade dos nociceptores durante a inflamação se mantém aumentada facilitando as sinapses nos cornos dorsais da medula espinhal. Já a sensibilização central ocorre devido a atividade dependente de sinapses no córtex envolvendo moduladores e aminoácidos excitatório, alterações em canais iônicos e ativação de quinases pré- e pós-sinápticas. O aumento nas sinapses permite que estímulos que normalmente são subliminares possam ativar neurônios nociceptivos que quando ativados provocam sensação de dor (Woolf 1983; Costigan *et al.* 2009).

Nossos dados demonstram que a hiperalgisia inflamatória mecânica, foi reduzida pelo bloqueio farmacológico dos receptores TRPA1 através do tratamento sistêmico com antagonista seletivo, o HC-030031. Corroborando com nossos achados, vários trabalhos têm demonstrado que o receptor TRPA1 possui um importante papel na detecção do estímulo mecânico em diferentes condições dolorosas. Neste sentido, Petrus e colaboradores (2007) com o uso de um antagonista seletivo do receptor TRPA1, o AP18, verificaram que o bloqueio farmacológico reduziu significativamente a hiperalgisia mecânica aguda induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. Em ratos, Eid e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento sistêmico com o HC-030031, outro antagonista seletivo do receptor TRPA1 reduziu a hiperalgisia mecânica aguda evocada pela injeção i.pl. de CFA. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o efeito anti-hiperalgésico decorrente do bloqueio farmacológico dos receptores TRPA1, também foi eficaz na dor neuropática, pois animais submetidos à ligação do nervo L5 e tratados com o HC-030031 apresentaram significativa redução da hiperalgisia mecânica. Mais recentemente, outro estudo demonstrou que a resposta visceromotora produzida pela distensão gástrica em camundongos, foi reduzida significativamente através da injeção i.t. do AS-ODN contra o receptor TRPA1, quando comparados com os animais que receberam a injeção i.t. de MM-ODN (Kondo *et al.* 2009). Além disso, resultados com camundongos submetidos a supressão gênica para o receptor TRPA1, também demonstram que este receptor TRPA1 desempenha um importante papel na detecção do estímulo mecânico. Corroborando com o envolvimento do TRPA1 na transmissão do estímulo mecânico, Cattaruzza e

colaboradores (2009) demonstraram que a ativação do TRPA1 induz hiperalgesia visceral e que animais com a deleção gênica para este receptor possuem uma marcante redução da hiperalgesia mecânica induzida pela inflamação do cólon.

Reforçando esses resultados *in vivo*, estudos *in vitro* mostraram que células CHO (ovário de hamster chinês) transfectadas com o receptor TRPA1 quando estimuladas com agonistas seletivos desse receptor, o cinamaldeído e isotiocianato de alila, causa um aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular, efeito esse que foi bloqueado pelo tratamento com HC-030031 (Eid *et al.* 2008). Da mesma forma, células CHO expressando o receptor TRPA1 apresentam aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  de forma concentração-dependente quando expostas a diferentes concentrações de cinamaldeído, efeito esse que foi bloqueado pelo antagonista seletivo do receptor TRPA1, o AP18 (Petrus *et al.* 2007). Em outro modelo de dor inflamatória, McNamara e colaboradores (2007) verificaram que a administração i.pl. de formalina em camundongos provoca comportamentos característicos de nociceção (lamber, morder e chacoalhar a pata estimulada), sendo que esse efeito foi reduzido pelo bloqueio dos receptores TRPA1 através do tratamento com HC-030031. Neste mesmo trabalho, foi verificado que animais com deleção gênica para o receptor TRPA1 apresentaram redução do comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de formalina quando comparados com animais selvagem. Nossos achados demonstram que o tratamento com o HC-030031 foi capaz de reduzir tanto a hiperalgesia mecânica aguda quanto crônica no modelo de CFA. É importante salientar que até o presente momento este é o primeiro estudo que demonstrou que o tratamento repetido com o antagonista seletivo do receptor TRPA1 reduz a hiperalgesia inflamatória crônica. Estudos sugerem que esse efeito prolongado da hiperalgesia mecânica causada pelo CFA é provavelmente mediado, pela indução de fatores de transcrição e de crescimento que são super-expressos por semanas após a lesão tecidual. Silvilia e colaboradores (2008) verificaram que na inflamação crônica induzida pela injeção i.pl. de CFA, ocorre aumento na expressão de NGF na pele de ratos analisados em estudos *ex vivo*. De forma semelhante, Spears e colaboradores (2005) mostraram que a injeção de CFA na articulação temporomandibular de ratos adultos provoca significativo aumento na expressão de NGF em neurônios do gânglio trigeminal por até seis semanas após a injeção do CFA. Reforçando esses dados, a injeção i.pl. de CFA

aumenta significativamente a expressão do gene BDNF na medula espinhal de ratos (Duric e McCarson 2007). Recentemente, demonstrou-se que o BDNF pode regular a expressão e a atividade de transdução do canal TRPA1, aumentando assim a sensibilidade neuronal a estímulos dolorosos (Ciobanu *et al.* 2009). Da mesma forma, Diogenes e colaboradores (2007) mostraram que o NGF participa da regulação da expressão do receptor TRPA1 em neurônios do gânglio trigeminal. Em conjunto, esses dados reforçam a hipótese de que diversas substâncias pró-inflamatórias podem modular o receptor TRPA1. De fato, nossos resultados demonstram claramente que o receptor TRPA1 desempenha um papel crucial na manutenção da hiperalgesia mecânica persistente.

Também relevante foram as observações que mostraram que o bloqueio do receptor TRPA1 através do pré-tratamento com HC-030031, ou seja, uma forma de tratamento preventivo, foi capaz de diminuir o surgimento da hiperalgesia inflamatória mecânica. É importante mencionar que a inflamação resulta na liberação de inúmeras substâncias, sendo muito delas substâncias neuroativas. Moléculas como a bradicinina, citocinas, prostanoídes, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, aminas simpatomiméticas entre outras são produzidas durante a inflamação por células residentes e migratórias (Coutaux *et al.* 2005). Assim, as terminações nervosas de fibras aferentes primárias são capazes de reconhecer e responder a cada molécula pró-algésica e inflamatória produzida nesse processo. Como resultado dessa interação, as fibras nervosas sensoriais aumentam sua excitabilidade, aumentando a responsividade neuronal a estímulos dolorosos, acarretando o aparecimento da hipersensibilidade térmica e mecânica (Basbaum *et al.* 2009). Trabalhos recentes mostraram que moléculas endógenas liberadas durante o processo inflamatório podem ativar diretamente os receptores TRPA1, incluindo o ácido araquidônico, a bradicinina, produtos do estresse oxidativo entre outras. (Bandell *et al.* 2004; Andersson *et al.* 2008). Cruz-Orengo e colaboradores mostraram que a 15d-PGJ<sub>2</sub> induz comportamento nociceptivo quando injetado na pata de camundongos via mecanismos dependentes do receptor TRPA1 (Cruz-Orengo *et al.* 2008). Da mesma forma, Trevisani e colaboradores (2007) demonstraram que a injeção subcutânea de 4-HNE (um aldeído produzido da peroxidação de lipídeos) na pata de camundongos, provoca comportamento nociceptivo que pode ser bloqueado por antagonistas do receptor TRPA1. Desse modo, a



abordagem terapêutica mais comum para a redução da dor inflamatória, envolve a inibição da síntese e/ou acúmulo de moléculas inflamatórias, como o uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidal (Basbaum e Woolf 1999; Besson 1999; Costigan e Woolf 2000; Basbaum *et al.* 2009). Entretanto, novas drogas que possam diretamente bloquear a ação de mediadores inflamatórios podem apresentar-se como futuras e inovadoras estratégias para o tratamento das dores inflamatórias

Nossos resultados mostram ainda que a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl de CFA, envolve a participação dos receptores TRPA1 localizados periférica e centralmente (espinhal). De fato, inúmeros trabalhos mostram que a distribuição do receptor TRPA1 está restrito aos neurônios de pequeno diâmetro da periferia (Patapoutian *et al.* 2009; Stucky *et al.* 2009). Utilizando as técnicas de *Western blot* e de imunohistoquímica, Nagata e colaboradores (2005) verificaram a expressão do receptor TRPA1 em neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD), trigeminal e nodoso, além de observar a expressão do receptor TRPA1 em neurônios de pequeno diâmetro da periferia utilizando anticorpos contra a região N-terminal (Nagata *et al.* 2005) e C-terminal do receptor (Bautista *et al.* 2005). Além disso, utilizando anticorpos contra o receptor TRPA1 nosso grupo de pesquisa demonstrou sua presença no nervo ciático e na medula espinhal (Andrade *et al.* 2008). Além disso, trabalho recente demonstrou que a hipersensibilidade mecânica induzida por estados diabéticos, parece depender da participação dos receptores TRPA1 espinhais, já que o tratamento i.t. com um antagonista seletivo dos receptores TRPA1 foi capaz de diminuir a hiperalgesia mecânica induzida pelo óleo de mostrada (Wei *et al.* 2010). Baseados nos achados da literatura e nos resultados obtidos por nosso grupo, podemos sugerir que o bloqueio espinhal e periférico dos receptores TRPA1 é capaz de diminuir a hiperalgesia aguda e crônica induzida pelo CFA. No entanto, verificamos que o tratamento i.c.v. com o HC-030031 não apresentou nenhum efeito anti-hiperalgésico. Isto nos sugere e nos mostra pela primeira vez que os receptores TRPA1 expressos em estruturas supraespinhais, parecem não estar envolvidos no controle da transmissão dolorosa durante condições de dor inflamatória. Apesar desse importante achado, nenhum estudo até o presente momento mostrou a expressão dos receptores TRPA1 em nível supraespinhal, sendo assim estudos que demonstram a localização em estruturas cerebrais, bem como,

sua participação em estados dolorosos representam um avanço importante nos processos envolvendo os receptores TRPA1.

Adicionalmente, aos achados comportamentais observados no presente estudo mostraram claramente que o receptor TRPA1 parece estar envolvido e na gênese e manutenção da hiperalgesia inflamatória, sendo este fenômeno doloroso acompanhado pelo aumento dos níveis do RNAm e da proteína para este receptor em neurônios sensoriais presentes no GRD e na medula espinhal, respectivamente. De acordo com nossos achados, Obata e colaboradores (2005) demonstraram que o processo inflamatório induz aumento significativo do RNAm para o receptor TRPA1 no GRD de camundongos no 1º e no 3º dia após a injeção i.pl. de CFA, retornando a níveis basais próximo ao 7º dia após o estímulo inflamatório. Esses resultados demonstram que diferentemente dos nossos dados, o envolvimento do receptor TRPA1 parece possuir papel crucial na hiperalgesia inflamatória aguda e persistente. Nossos dados mostram ainda que o pré-tratamento com o HC-030031 diminuiu significativamente a expressão dos receptores TRPA1 no GRD e na medula espinhal. Estes achados sugerem que a ativação do TRPA1 pode regular sua própria expressão, por mecanismos de auto-regulação. De fato, essa característica funcional de auto-regulação do receptor, ao nosso conhecimento, está sendo descrita pela primeira vez. De fato, como mencionado anteriormente, a ativação do receptor TRPA1 promove o influxo de  $Ca^{+2}$  intracelular e, conseqüentemente, a ativação de segundos mensageiros. O aumento do  $Ca^{+2}$  citosólico livre desempenha papel central em muitos processos celulares incluindo na contração muscular, na liberação de transmissores, na proliferação celular, na transcrição de genes e na morte celular (Berridge *et al.* 2000). Deste modo, o bloqueio dos receptores TRPA1 pode estar influenciando na expressão de importantes genes que podem regular a sua própria expressão, como por exemplo o NGF. De fato, a injeção s.c. diária de NGF em ratos, aumenta significativamente o RNAm para o receptor TRPA1 (Diogenes *et al.* 2007).

Estímulos térmicos detectados pelo organismo acontecem de forma semelhante para calor e o frio. A detecção de estímulos térmicos ao calor nocivo decorrente da ativação de receptores da família TRP, mais especificamente por receptores do tipo vanilóide (TRPV), é bem elucidado e descrito na literatura científica. Porém, a detecção do frio nocivo pelos receptores TRPA1 ainda merece especial

atenção. Estudos recentes demonstram que as estruturas sensoriais que detectam temperaturas entre 15 e 30 °C parecem ser fibras nervosas do tipo A $\delta$  e C (Dubner *et al.* 1975; LaMotte e Thalhammer 1982; Campero *et al.* 2001). Fibras aferentes sensíveis à temperatura informam continuamente o SNC sobre mudanças na temperatura corporal. Acredita-se que a sensação dolorosa ao frio acontece em temperaturas abaixo de 15 °C e parece ser detectada pelos receptores TRPA1, pois sua ativação acontece abaixo dos 16 °C (Morin e Bushnell 1998; Kwan e Corey 2009).

A participação dos receptores TRPA1 na detecção do frio nocivo ainda gera grandes discussões entre diferentes investigadores. Nossos resultados demonstram que a hiperalgesia térmica evocada pelo frio nocivo foi reduzida significativamente quando os animais foram tratados sistemicamente com o antagonista seletivo do receptor TRPA1, o HC-030031. Suportando nossos achados, Kwan e colaboradores (2006), com o uso de animais deficientes do receptor TRPA1, demonstram significativa redução nas respostas à estimulação nociva ao frio quando comparada com animais selvagens. Além disso, os mesmo autores demonstraram que animais deficientes do receptor TRPA1 apresentaram redução na sensibilidade à sensação ao frio quando estimulados com acetona (Kwan *et al.* 2006). Neste sentido, um trabalho recente mostrou que animais com deleção gênica pra o receptor TRPA1 apresentam diminuição significativa no comportamento nociceptivo quando avaliados pelo teste da placa fria e retirada da cauda, quando comparados com animais selvagens (Karashima *et al.* 2009). Contudo, um estudo envolvendo o bloqueio do receptor TRPA1 demonstra que a injeção i.pl. de CFA em ratos provoca intensa hiperalgesia ao frio, um efeito que foi fortemente bloqueado pela administração i.pl. do AP18, antagonista TRPA1, conseqüentemente reduzindo assim o comportamento nociceptivo (Obata *et al.* 2005). Em outros modelos experimentais foi demonstrado ainda que a ligação do nervo L-5 em ratos provoca aumento significativo na hiperalgesia térmica (frio) que pode ser revertido com o tratamento com o antisense contra o receptor TRPA1 (Katsura *et al.* 2006). Obata e colaboradores (2005) demonstraram através dos modelos de dor inflamatória e neuropática o surgimento de intensa hiperalgesia ao frio duradoura, sendo que este fenômeno doloroso ao frio (i.e. hiperalgesia) foi reduzida quando os animais foram tratados com o antisense contra o receptor TRPA1. Interessantemente, um recente

trabalho propõe que o mecanismo envolvido na ativação dos receptores TRPA1 é dependente de ERK5, pois animais com hiperalgesia ao frio induzido pela injeção i.pl. de CFA, apresentavam redução no comportamento nociceptivo quando tratados com RNAi de interferência contra ERK5. Além disso, o tratamento com o RNA de interferência contra a ERK5 diminui de forma significativa a expressão dos receptores TRPA1 em GRDs de ratos (Katsura *et al.* 2007). Outro trabalho fornece evidências de que a estimulação nociva ao frio ativa proteínas quinases como a ERK e a p38 *in vivo* e que essas proteínas são coexpressas juntamente com receptores TRPA1 em fibras de pequeno diâmetro nos GRDs (Mizushima *et al.* 2006). Ao contrário, existem evidências experimentais que mostram o não envolvimento do receptor TRPA1 na detecção do frio nocivo (Bautista *et al.* 2006). Bautista e colaboradores (2006) utilizando animais deficientes dos receptores TRPA1, mostraram que esses mesmos animais quando submetidos a testes comportamentais da placa fria e da acetona, não apresentam diferenças significativas na sensibilidade ao frio quando comparados com animais selvagens. Da mesma forma, estudos envolvendo pacientes com lesão nervosa evocada pelo frio, mostraram que a alodínia térmica ao frio acontece de forma independente dos receptores TRPA1 e TRPM8 (Namer *et al.* 2008).

Reforçando os trabalhos *in vivo* que caracterizam o envolvimento do receptor TRPA1 na transdução do frio, um dos primeiros trabalhos que evidenciam a participação desta proteína na detecção do frio nocivo *in vitro*, demonstrou que células CHO transfectadas com o receptor TRPA1 quando estimuladas pelo frio aumentam significativamente o influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular, sendo que este efeito pode ser bloqueado por um antagonista para os TRPs, o vermelho de rutênio (Story *et al.* 2003). Mais recentemente, Karashima e colaboradores (2009) demonstraram que temperaturas abaixo de 10°C resultam em um robusto aumento no influxo de  $Ca^{+2}$  intracelular em células expressando TRPA1, e que este influxo parece ser de modo independente dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ .

Apesar da grande maioria dos trabalhos apontarem o receptor TRPA1 como uma importante proteína na percepção do frio nocivo, algumas evidências controversas sobre a participação já foram demonstradas na literatura. Isto pode ser justificado pelo menos em parte pelo emprego de diferentes metodologias, bem como pela

utilização de diferentes espécies de animais (Story e Gereau 2006). De fato, trabalho recente mostrou que existe uma importante diferença na sequência de aminoácidos do receptor TRPA1 entre as diferentes espécies animais (Chen e Kym 2009). Estudos mostram que apesar da similaridade da homologia do TRPA1 entre humanos, ratos e camundongos, os mesmos apresentam diferentes perfis de respostas quando estimulados pelo mesmo agonista seletivo, ou seja, apresentam sensibilidade diferente entre espécies (Klionsky *et al.* 2007; Chen e Kym 2009).

Nossos resultados, juntamente com dados da literatura, confirmam a participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia térmica ao frio nocivo. De fato, o tratamento i.t. do antisense contra o receptor TRPA1 confirma a hipótese de que a hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de CFA é dependente de receptores TRPA1.

Os resultados do presente estudo confirmam que o receptor TRPA1 é importante modulador da hiperalgesia térmica (frio) aguda e também na hiperalgesia mecânica crônica, ambas provocadas pela injeção i.pl. de CFA. Da mesma forma, a hiperalgesia inflamatória crônica ao frio nocivo foi revertida pelo tratamento repetido com o HC-030031 quando analisados em diferentes períodos de tempo. De fato, Jasmin e colaboradores (1998) verificou através do teste de placa fria (5° C) que a injeção i.pl. de CFA provoca uma hiperalgesia térmica (fria) de longa duração, que pode perdurar por até 60 dias após o estímulo inflamatório. Além disso, utilizando modelos de dor neuropática, Ji e colaboradores (2008) verificaram que animais submetidos a ligação do nervo espinhal L5, apresentavam aumento nas respostas nociceptivas ao frio no teste da placa fria. Adicionalmente, o envolvimento do receptor TRPA1 na neuropatia foi demonstrado após aplicação i.pl. de óleo de mostarda, um agonista seletivo dos receptores TRPA1, em animais submetidos à ligação do nervo L5, onde estes mesmos animais apresentaram comportamento nociceptivo mais elevado em comparação aos animais falso operados. É importante salientar que apesar de inúmeros trabalhos demonstrarem a participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia térmica tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é a primeira evidência na literatura de que os receptores TRPA1 participam na manutenção da hiperalgesia térmica ao frio induzida por estados inflamatórios. Além disso, o tratamento repetido com o antagonista seletivo dos receptores TRPA1, o HC-030031 parece não estar associado com o desenvolvimento de tolerância em camundongos.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho demonstram que o receptor TRPA1, quando ativado em estados de inflamação persistente, é responsável pelo desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica (frio). Além disso, nossos dados demonstram que a hiperalgesia causada pelo CFA é dependente de receptores TRPA1 local e central (espinhal), porém os receptores TRPA1 cerebrais parecem não estar envolvidos no controle e manutenção da dor. Nossos dados ainda mostram que a ativação do receptor parece controlar sua própria expressão em um processo de auto-regulação observado em outros tipos de receptores. O estudo do envolvimento do receptor TRPA1 nos processos de hiperalgesia inflamatória e dos mecanismos envolvidos na ativação deste receptor são promissores na perspectiva de se desenvolver novas estratégias terapêuticas úteis no tratamento de distúrbios dolorosos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akopian, A. N., N. B. Ruparel, et al. (2007). "Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization." J Physiol **583**(Pt 1): 175-93.
- Allchorne, A. J., D. C. Broom, et al. (2005). "Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats." Mol Pain **1**: 36.
- Almeida, T. F., S. Roizenblatt, et al. (2004). "Afferent pain pathways: a neuroanatomical review." Brain Res **1000**(1-2): 40-56.
- Andersson, D. A., C. Gentry, et al. (2008). "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress." J Neurosci **28**(10): 2485-94.
- Andrade, E. L., A. P. Luiz, et al. (2008). "Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice." Neuroscience **152**(2): 511-20.
- Ashburn, M. A. and P. S. Staats (1999). "Management of chronic pain." Lancet **353**(9167): 1865-9.
- Atoyan, R., D. Shander, et al. (2009). "Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin." J Invest Dermatol **129**(9): 2312-5.
- Bandell, M., G. M. Story, et al. (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." Neuron **41**(6): 849-57.
- Bang, S., K. Y. Kim, et al. (2007). "Transient receptor potential A1 mediates acetaldehyde-evoked pain sensation." Eur J Neurosci **26**(9): 2516-23.
- Barrera, N. P., Y. Shaifita, et al. (2007). "AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel." Biochem Biophys Res Commun **358**(4): 1086-90.

- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-84.
- Basbaum, A. I. and C. J. Woolf (1999). "Pain." Curr Biol **9**(12): R429-31.
- Bautista, D. M., S. E. Jordt, et al. (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." Cell **124**(6): 1269-82.
- Bautista, D. M., P. Movahed, et al. (2005). "Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12248-52.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Besson, J. M. (1999). "The neurobiology of pain." Lancet **353**(9164): 1610-5.
- Bessou, P. and E. R. Perl (1969). "Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli." J Neurophysiol **32**(6): 1025-43.
- Bortalanza, L. B., J. Ferreira, et al. (2002). "Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice." Eur J Pharmacol **453**(2-3): 203-8.
- Calixto, J. B., C. A. Kassuya, et al. (2005). "Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions." Pharmacol Ther **106**(2): 179-208.
- Calvino, B. and R. M. Grilo (2006). "Central pain control." Joint Bone Spine **73**(1): 10-6.
- Campero, M., J. Serra, et al. (2001). "Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin." J Physiol **535**(Pt 3): 855-65.
- Caspani, O. and P. A. Heppenstall (2009). "TRPA1 and cold transduction: an unresolved issue?" J Gen Physiol **133**(3): 245-9.



- Caterina, M. J., A. Leffler, et al. (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-13.
- Cattaruzza, F., I. Spreadbury, et al. (2009). "Transient Receptor Potential Ankyrin-1 has a Major Role in Mediating Visceral Pain in Mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.
- Chen, J. and P. R. Kym (2009). "TRPA1: the species difference." J Gen Physiol **133**(6): 623-5.
- Chichorro, J. G., A. R. Zampronio, et al. (2006). "Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs." Pain **123**(1-2): 64-74.
- Ciobanu, C., G. Reid, et al. (2009). "Acute and chronic effects of neurotrophic factors BDNF and GDNF on responses mediated by thermo-sensitive TRP channels in cultured rat dorsal root ganglion neurons." Brain Res **1284**: 54-67.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-24.
- Corey, D. P., J. Garcia-Anoveros, et al. (2004). "TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells." Nature **432**(7018): 723-30.
- Costigan, M., A. Moss, et al. (2009). "T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity." J Neurosci **29**(46): 14415-22.
- Costigan, M., J. Scholz, et al. (2009). "Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage." Annu Rev Neurosci **32**: 1-32.
- Costigan, M. and C. J. Woolf (2000). "Pain: molecular mechanisms." J Pain **1**(3 Suppl): 35-44.
- Coutaux, A., F. Adam, et al. (2005). "Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms." Joint Bone Spine **72**(5): 359-71.

- Cruz-Orengo, L., A. Dhaka, et al. (2008). "Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1." Mol Pain **4**: 30.
- Dai, Y., S. Wang, et al. (2007). "Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain." J Clin Invest **117**(7): 1979-87.
- Diogenes, A., A. N. Akopian, et al. (2007). "NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain." J Dent Res **86**(6): 550-5.
- Dubner, R., R. Sumino, et al. (1975). "A peripheral "cold" fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face." J Neurophysiol **38**(6): 1373-89.
- Duric, V. and K. E. McCaig (2007). "Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain." Mol Pain **3**: 32.
- Eid, S. R., E. D. Crown, et al. (2008). "HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity." Mol Pain **4**: 48.
- Ferreira, J., M. M. Campos, et al. (2001). "Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice." Neuropharmacology **41**(8): 1006-12.
- Garcia-Anoveros, J. and K. Nagata (2007). "Trpa1." Handb Exp Pharmacol(179): 347-62.
- Hunt, S. P. and P. W. Mantyh (2001). "The molecular dynamics of pain control." Nat Rev Neurosci **2**(2): 83-91.
- Hylden, J. L. and G. L. Wilcox (1980). "Intrathecal morphine in mice: a new technique." Eur J Pharmacol **67**(2-3): 313-6.
- Jaquemar, D., T. Schenker, et al. (1999). "An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts." J Biol Chem **274**(11): 7325-33.

- Jasmin, L., L. Kohan, et al. (1998). "The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models." Pain **75**(2-3): 367-82.
- Ji, G., S. Zhou, et al. (2008). "Intact Adelta-fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats." Neuroscience **154**(3): 1054-66.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-10.
- Karashima, Y., K. Talavera, et al. (2009). "TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1273-8.
- Kashiba, H., Y. Uchida, et al. (2003). "Distribution and colocalization of NGF and GDNF family ligand receptor mRNAs in dorsal root and nodose ganglion neurons of adult rats." Brain Res Mol Brain Res **110**(1): 52-62.
- Katsura, H., K. Obata, et al. (2007). "Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation." J Neurochem **102**(5): 1614-24.
- Katsura, H., K. Obata, et al. (2006). "Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats." Exp Neurol **200**(1): 112-23.
- Klionsky, L., R. Tamir, et al. (2007). "Species-specific pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists." Mol Pain **3**: 39.
- Kobayashi, K., T. Fukuoka, et al. (2005). "Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors." J Comp Neurol **493**(4): 596-606.
- Kondo, T., K. Obata, et al. (2009). "Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats." Gut **58**(10): 1342-52.

- Kwan, K. Y., A. J. Allchorne, et al. (2006). "TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction." Neuron **50**(2): 277-89.
- Kwan, K. Y. and D. P. Corey (2009). "Burning cold: involvement of TRPA1 in noxious cold sensation." J Gen Physiol **133**(3): 251-6.
- LaMotte, R. H. and J. G. Thalhammer (1982). "Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate." Brain Res **244**(2): 279-87.
- Latremoliere, A. and C. J. Woolf (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." J Pain **10**(9): 895-926.
- Laursen, S. E. and J. K. Belknap (1986). "Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements." J Pharmacol Methods **16**(4): 355-7.
- Lerner, J. (2008). "Intellectual property and development at WHO and WIPO." Am J Law Med **34**(2-3): 257-77.
- Levine, J. D. and N. Alessandri-Haber (2007). "TRP channels: targets for the relief of pain." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 989-1003.
- Loeser, J. D. and R. Melzack (1999). "Pain: an overview." Lancet **353**(9164): 1607-9.
- Loeser, J. D. and R. D. Treede (2008). "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology." Pain **137**(3): 473-7.
- Macpherson, L. J., A. E. Dubin, et al. (2007). "Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines." Nature **445**(7127): 541-5.
- Macpherson, L. J., B. Xiao, et al. (2007). "An ion channel essential for sensing chemical damage." J Neurosci **27**(42): 11412-5.
- Manjavachi, M. N., N. L. Quintao, et al. (2009). "The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice." Eur J Pain.

- McKemy, D. D. (2005). "How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation." Mol Pain **1**: 16.
- McNamara, C. R., J. Mandel-Brehm, et al. (2007). "TRPA1 mediates formalin-induced pain." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13525-30.
- Melzack, R. (1999). "Pain--an overview." Acta Anaesthesiol Scand **43**(9): 880-4.
- Meyer, R. A., Ringkamp, M., Campbell, J.N. e Raja, S.N. (2008). Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. Philadelphia: Elsevier.
- Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." Prog Neurobiol **57**(1): 1-164.
- Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." Prog Neurobiol **66**(6): 355-474.
- Mizushima, T., K. Obata, et al. (2006). "Noxious cold stimulation induces mitogen-activated protein kinase activation in transient receptor potential (TRP) channels TRPA1- and TRPM8-containing small sensory neurons." Neuroscience **140**(4): 1337-48.
- Morin, C. and M. C. Bushnell (1998). "Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study." Pain **74**(1): 67-73.
- Nagata, K., A. Duggan, et al. (2005). "Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing." J Neurosci **25**(16): 4052-61.
- Namer, B., I. P. Kleggetveit, et al. (2008). "Role of TRPM8 and TRPA1 for cold allodynia in patients with cold injury." Pain **139**(1): 63-72.
- Obata, K., H. Katsura, et al. (2005). "TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury." J Clin Invest **115**(9): 2393-401.

- Olsson, Y. (1990). "Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions." Crit Rev Neurobiol **5**(3): 265-311.
- Paszczuk, A. F., V. M. Gadotti, et al. (2007). "Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice." Brain Res **1159**: 124-33.
- Patapoutian, A., S. Tate, et al. (2009). "Transient receptor potential channels: targeting pain at the source." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 55-68.
- Petrus, M., A. M. Peier, et al. (2007). "A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition." Mol Pain **3**: 40.
- Pfingsten, M. (2009). "[Chronic low back pain--need for an interdisciplinary approach]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **44**(1): 40-5; quiz 46.
- Quintao, N. L., R. Medeiros, et al. (2005). "The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice." Anesth Analg **101**(6): 1763-9.
- Reid, G. (2005). "ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to?" Pflugers Arch **451**(1): 250-63.
- Rexed, B. (1954). "A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat." J Comp Neurol **100**(2): 297-379.
- Riedel, W. and G. Neeck (2001). "Nociception, pain, and antinociception: current concepts." Z Rheumatol **60**(6): 404-15.
- Rittner, H. L., A. Brack, et al. (2008). "Pain and the immune system." Br J Anaesth **101**(1): 40-4.
- Russo, C. M. and W. G. Brose (1998). "Chronic pain." Annu Rev Med **49**: 123-33.
- Schaefer, M. (2005). "Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits." Pflugers Arch **451**(1): 35-42.

- Schmidt, M., A. E. Dubin, et al. (2009). "Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane." Neuron **64**(4): 498-509.
- Schmidt, R., M. Schmelz, et al. (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." J Neurosci **15**(1 Pt 1): 333-41.
- Sivilia, S., M. Paradisi, et al. (2008). "Skin homeostasis during inflammation: a role for nerve growth factor." Histol Histopathol **23**(1): 1-10.
- Spears, R., L. A. Dees, et al. (2005). "Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation." J Orofac Pain **19**(1): 34-40.
- Stein, C., J. D. Clark, et al. (2009). "Peripheral mechanisms of pain and analgesia." Brain Res Rev **60**(1): 90-113.
- Story, G. M. and R. W. t. Gereau (2006). "Numbing the senses: role of TRPA1 in mechanical and cold sensation." Neuron **50**(2): 177-80.
- Story, G. M., A. M. Peier, et al. (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-29.
- Stucky, C. L., A. E. Dubin, et al. (2009). "Roles of transient receptor potential channels in pain." Brain Res Rev **60**(1): 2-23.
- Thut, P. D., D. Wrigley, et al. (2003). "Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro." Neuroscience **119**(4): 1071-83.
- Trevisani, M., J. Siemens, et al. (2007). "4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13519-24.
- Wang, S., Y. Dai, et al. (2008). "Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain." Brain **131**(Pt 5): 1241-51.

- Watanabe, H., M. Murakami, et al. (2008). "TRP channel and cardiovascular disease." Pharmacol Ther **118**(3): 337-51.
- Wei, H., H. Chapman, et al. (2010). "Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat." Neuropharmacology **58**(3): 578-84.
- Woolf, C. J. (1983). "Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity." Nature **306**(5944): 686-8.
- Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." Neuron **55**(3): 353-64.
- Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999). "Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management." Lancet **353**(9168): 1959-64.
- Zimmermann, M. (1986). "Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation." Acta Physiol Scand Suppl **554**: 221-33.



## 7. ANEXO