



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO HC-030031, UM ANTAGONISTA SELETIVO
DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA SUBTIPO 1 (TRPA1),
EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO VISCERAL**

FORTALEZA

2011

LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO HC-030031, UM ANTAGONISTA SELETIVO
DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA SUBTIPO 1 (TRPA1),
EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO VISCERAL

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P492e

Pereira, Lus Mário da Silva

Efeito antinociceptivo do HC-030031, um antagonista seletivo do receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1), em modelos de nocicepção visceral/ Lus Mário da Silva Pereira. – 2011.

116 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

1. Nociceptores 2. Visceras 3. Cistite 4. Hemorragia 5. Antagonismo de Drogas 6. Medição da Dor 7. Ifosfamida I.Título.

CDD 615.1

LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO HC-030031, UM ANTAGONISTA SELETIVO
DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA SUBTIPO 1 (TRPA1),
EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO VISCERAL**

Dissertação apresentada á Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia
como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
(Co-Orientador)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Herbert Arlindo Trebien
Departamento de Farmacologia
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Ao meu maior orgulho e amor: minha família.

Em especial aos meus pais: *José Maria* e *Lucineide*, pela paciência, esforço e exclusiva dedicação na condução da minha educação e de todos os meus irmãos.”

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por todas as bênçãos recebidas, por me dá sabedoria para vencer os desafios e ter me cercado de pessoas que me auxiliaram nesta jornada.

Ao professor *Ronaldo* de Albuquerque Ribeiro pela oportunidade de realizar este trabalho no LAFICA. Pela atenção e confiança em mim depositada durante todo esse tempo, pela relevante contribuição na minha formação científica por acreditar no meu potencial dando exemplo naquilo que o faz um excelente professor, a buscar incessante pelo conhecimento.

Ao professor *Roberto César* Pereira Lima Júnior, pela relevante contribuição na minha formação científica, co-orientação, apoio nos experimentos, gentileza em todos os momentos, relevante cooperação na realização deste trabalho e acima de tudo pela amizade.

A todos os professores da banca examinadora que contribuíram no aprimoramento deste trabalho de pesquisa.

A professora *Mariana* Lima Vale pelos valiosos conhecimentos compartilhados neste trabalho e também pela acolhida em seu laboratório e também aos professores *Marcellus*, *Gerly Anne* e *Pedro* por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de Pós-Graduação: *Ana Paula* Macedo, *Livia* Mourão, *Flávio* Bitencourt, *Nelson* Belarmino em especial à *Deysi* Wong e *Karol* Aragão pela ajuda, cooperação, sugestões e inventivos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica: *Amanda* Ximenes, *Cayo* Teixeira, *Lucas* Grassi, *Raul* Medeiros, *Rodrigo* Callado e *Sá Neto* pelo apoio na execução dos experimentos em todos os momentos prontos para auxiliar.

A nossa técnica de laboratório *Vandinha* pela dedicação a todos os alunos do LAFICA e preciosa ajuda em todos os momentos de nosso trabalho.

Ao Dr. *Armando Lemos* (Veterinário) e ao técnico de laboratório *Haroldo* do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pelo empenho na solicitação dos animais tão preciosos no desenvolvimento deste trabalho.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação em Farmacologia *Àurea* e *Márcia* pela ajuda com as questões burocráticas.

Ao *Paulo Marcelo* Moraes Santana Farmacêutico do Hospital do Câncer do Ceará pelo apoio e cooperação.

Aos meus irmãos *Liscélio*, *Liliana* e *Ana Lucy* pelo apoio nas questões pessoais.

A minha querida esposa *Fernandinha* e filha *Ana Livia* por entender a importância deste trabalho em minha vida abdicando freqüentemente de momentos em família.

A todos os *professores* do curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pelos relevantes conhecimentos compartilhados durante o curso deste trabalho.

Aos *meus colegas* do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram de alguma forma para enriquecer-me de seus conhecimentos.

À bibliotecária *Rosane* Maria Costa, da Biblioteca de Ciências da Saúde da UFC, pelo apoio na correção das referências bibliográficas e normatização de todo o trabalho.

À *CAPES* e *FUNCAP*, pelo apoio financeiro.

A *todos*, meus sinceros agradecimentos.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

I Coríntios 13: 1,2 – Bíblia Sagrada.

“ Por isso não desfalecemos; mas ainda que o nosso homem exterior esteja consumido, o interior, contudo, se renova dia após dia. ”

II Coríntios 4:16 – Bíblia Sagrada.

RESUMO

Efeito antinociceptivo do HC-030031, um antagonista seletivo do receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1), em modelos de nocicepção visceral.- LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

A família de receptores de potencial transitório (TRP) incluindo o receptor de potencial transitório anquirina, subtipo 1 (TRPA1) tem mostrado ser um alvo terapêutico potencial para o tratamento da dor aguda e crônica. Alguns estudos têm demonstrado que a resposta nociceptiva somática se deve à ativação dos receptores TRPA1 e são efetivamente modulados através da ferramenta experimental, HC-030031, um antagonista seletivo. Contudo, existem poucos estudos que avaliam o papel dos receptores TRPA1 na dor visceral. Portanto, investigamos o papel do TRPA1 em modelos animais de nocicepção visceral induzido por diferentes substâncias e também exploramos os possíveis mecanismos envolvidos. Camundongos Swiss, machos (N=6) receberam carboximetilcelulose 0,5% (veículo CMC 0,5%, 1 mL/Kg, v.o.), HC-030031 (75, 150 ou 300 mg/Kg, v.o.), ou L-NAME (10 e 40 mg/Kg, s.c.) ou somente L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.), 1 h após foi administrado uma única injeção de IFO (400 mg/Kg, i.p.). A nocicepção visceral foi avaliada através do teste de Von Frey eletrônico previamente (T0) e 12 h (T1) após a injeção de IFO com estimulação abdominal através de um analgesímetro digital. Os resultados foram obtidos em gramas (T0-T1) pela variação da hiperalgesia. Em seguida as bexigas dos animais foram removidas para pesagem, análise e foram atribuídos escores macro e microscopicamente. Investigou-se, também, o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 através do modelo de nocicepção visceral induzido por óleo de mostarda (OM). Os animais foram tratados com CMC 0,5%, HC-030031 (18,75; 37,5 ou 75 mg/kg, v.o.) ou Morfina (5 mg/Kg, s.c.) isoladamente ou receberam Naloxona (2 mg/Kg, i.p.) previamente a estas drogas. Em seguida, OM 0,75% (50 µL/colon) foi instilado localmente no cólon. A nocicepção visceral foi verificada através do teste de Von Frey previamente (T0) e 10 min. (T1) após a injeção do OM. Em outro protocolo experimental, os animais foram tratados com CMC 0,5% (10 mL/kg, v.o.) ou HC-030031 (18,75; 37,5 ou 75 mg/Kg, v.o.) previamente a uma injeção intraperitoneal com ácido acético 0,6% (AA, 10 mL/Kg), zymosan (Zym, 1 mg/cavidade) ou misoprostol (MPT, 1 µg/cavidade, um análogo estável de prostaglandinas). Imediatamente após a injeção desses algôgenos, contabilizaram-se as contorções abdominais por 30 min. Adicionalmente, para investigar o papel de células peritoneais residentes sobre o efeito do HC-030031, a cavidade peritoneal dos camundongos foi lavada com uma solução de 30 mL (PBS + heparina) e os estímulos AA, Zym e MPT foram injetados i.p. Um grupo Sham foi incluído também neste protocolo. Ao final do experimento, as contorções abdominais foram registradas por 30 min. Utilizou-se para a análise estatística, ANOVA/Student e Newman/Keul, foi considerado significativo um $p < 0,05$ (CEPA: Protocolo: 92/10). A IFO induziu significativa ($p < 0,05$) nocicepção visceral ($6,25 \pm 1,08$) e resposta inflamatória [escores edema 2(1-3); hemorragia 3(1-3) e peso bexiga ($42,78 \pm 3,10$)] comparado com o grupo salina ($1,97 \pm 0,89$), [0(0-0); 0(0-0) e $20,01 \pm 0,7749$] respectivamente. Além disso, HC-030031 (75 mg/Kg) e L-NAME (10 e 40 mg/Kg) preveniram de maneira significativa ($p < 0,05$) da resposta nociceptiva ($2,30 \pm 1,07$; $1,58 \pm 0,86$ e $0,2500 \pm 0,73$) respectivamente quando comparado com o grupo IFO. O pré-tratamento com L-Arginina ($6,844 \pm 1,235$) reverteu o efeito antinociceptivo do L-NAME 10 mg/Kg, ($6,84 \pm 1,23$), mas foi ineficaz sobre o efeito do L-NAME 40 mg/Kg ($1,500 \pm 0,7361$) e HC-030031 75 mg/Kg ($0,7200 \pm 0,6953$). Contudo, o pré-tratamento com HC-030031 não apresentou efeito antiinflamatório. Adicionalmente, verificou-se que o OM induziu significativo ($p < 0,05$) comportamento nociceptivo ($6,333 \pm 0,9458$) quando comparado ao grupo salina ($1,250 \pm 0,9204$). Além disso, o HC-030031 preveniu de maneira significativa da resposta nociceptiva provocada pelo OM ($1,536 \pm 0,7653$). Avaliou-se também o envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do HC-030031. Verificou-se que a morfina apresentou uma importante atividade antinociceptiva ($0,07143 \pm 0,07143$) contra a nocicepção induzida por OM a qual foi significativamente revertida pelo pré-tratamento com naloxona ($3,125 \pm 1,302$). Por outro lado, o efeito antinociceptivo do HC-030031 não foi afetado pela naloxona ($2,240 \pm 1,263$). Adicionalmente, AA, Zym e MPT induziram respostas de contorções abdominais significativas ($43,71 \pm 4,43$; $11,00 \pm 2,11$ e $9,00 \pm 2,30$, respectivamente) as quais foram significativamente inibidas com HC-030031 (18,75, 37,5 ou 75 mg/kg, v.o.) em todas as doses utilizadas no teste com AA (29,07%; 53,35% e 41,59%), no teste com Zym (55,85%; 61,03% e 71,20%) e no teste com MPT (63,88%; 83,33% e 88,88%). Uma vez que a prostaglandina ativa o nociceptor diretamente, demonstrou-se que o HC-030031 possivelmente inibe a nocicepção visceral através da estabilização direta de nociceptores. O efeito antinociceptivo do HC-030031 parece ser independente da inibição de células residentes inflamatórias, do óxido nítrico ou do sistema opióide. Este estudo fornece perspectivas para o manuseio da dor visceral através da modulação dos canais TRPA1.

Palavras-Chave: Receptor de Potencial Transitório Anquirina, subtipo 1 (TRPA1); Nocicepção Visceral, Cistite Hemorrágica; HC-030031.

ABSTRACT

Antinociceptive effect of HC-030031, a selective antagonist of transient receptor potential ankirin subtype 1 (TRPA1), on experimental models of visceral nociception. LUS MÁRIO DA SILVA PEREIRA. Dissertation of the master degree application. Pharmacology Post-Graduation Program. School of Medicine - Federal University of Ceará. Advisor: Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

The description of the TRP family of receptors including TRPA1 has provided potential therapeutic targets for treating acute and chronic pain. Some studies have shown a somatic nociceptive response due to the TRPA1 receptors activation which is effectively modulated with the experimental tool, HC-030031, a TRPA1 antagonist. However, there are a few studies evaluating the role of TRPA1 receptors in visceral pain. Then aimed to investigate the role of TRPA1 in the animal models of visceral nociception induced by different substances and to explore the possible mechanisms involved. Swiss male mice (n=6) were given only Carboxymethyl cellulose (vehicle CMC 0.5%, 1 mL/kg, p.o.), the compound HC-030031 (75, 150 or 300 mg/Kg, p.o.) or L-NAME (10 or 40 mg/Kg, s.c.) alone or with L-arginine (600mg/Kg, i.p.) 1h previously a alone injection of IFO (400 mg/kg, i.p.). Visceral nociception was assessed through the von Frey test previously (T0) and 12h (T1) later IFO injection by the abdominal stimulation with a pressure meter. The results were obtained in grams (T0-T1). The bladder of these animals were also removed to weighted (BWW), analyzed and after given scores macro and microscopically. We also investigated the antinociceptive effect of HC-030031 in the model of mustard oil-induced visceral nociception. The animals were treated with CMC 0.5% or HC-030031 (18.75, 37,5 or 75 mg/kg) or Morphine (5 mg/Kg, s.c.) alone or with Naloxone (2 mg/Kg, i.p.) 1h previously the injection of Mustard oil (MO) 0,75% (MO, 50 ul/colon). Visceral nociception was assessed through the von Frey test previously (T0) and 10 min (T1) after MO injection by the abdominal stimulation with a pressure meter. The results were obtained in grams (T0-T1). In another experimental setting, the animals were treated with CMC 0.5% (1 mL/kg, p.o.) or HC-030031 (18.75; 37.5 or 75mg/Kg, p.o.) previously an intraperitoneal injection with acetic acid 0.6% (AA, 10 mL/kg), zymosan (Zym, 1 mg/cavity) or misoprostol (MPT, a stable prostaglandin analogous, 1µg/cavity) and immediately had the writhing responses counted for 30 min. In order to investigate the role of resident peritoneal cells on the effect of HC-030031, we washed the peritoneal cavity of mice with heparin added PBS (30 mL) and then AA, Zym or MPT were injected i.p. A Sham group was included. Eventually, the writhing responses were recorded. Statistical analysis was performed with ANOVA/Student Newman Keul as appropriate. $p < 0.05$ was accepted. (CEPA: Protocol 92/10). IFO induced significant ($p < 0.05$) visceral nociception (6.25 ± 1.08) and inflammatory response [scores to edema 2(1-3); hemorrhage 3(1-3); and bladder wet weight (42.78 ± 3.1)] in comparison with saline treated group (1.97 ± 0.89), [0(0-0); 0(0-0); 20.01 ± 0.7749] respectively. Moreover, HC-030031(75) and L-NAME (10 or 40 mg/Kg) prevented in a significant manner ($p < 0.05$) the nociceptive response (2.30 ± 1.07 ; 1.58 ± 0.860 and 2500 ± 0.7361) respectively when compared with IFO-treated group. Although the pretreatment with L-arginine (6.844 ± 1.235) was able to reverse the antinociceptive effect of L-NAME 10 mg/Kg, (6.84 ± 1.23), it failed to do the same ($p > 0.05$) with L-NAME 40 mg/Kg (1.500 ± 0.7361) and HC-0300031 75 mg/Kg (0.72 ± 0.69). The same reversible effect of L-Arginine was observed for the anti-inflammatory activity of L-NAME ($p < 0.05$). However, HC-030031 presented no anti-inflammatory effect. The antinociceptive activity of HC-030031 was also assessed in the MO nociception model. We verified that MO induced a significant ($p < 0.05$) nociceptive behavior (6.333 ± 0.9458) when compared to saline injected mice (1.250 ± 0.9204). Moreover, HC-030031 prevented in a significant manner the nociceptive response elicited by MO (1.536 ± 0.7653). Furthermore, the involvement of opioid system in the antinociceptive effect of HC-030031 as tested. We observed that morphine presented an important antinociceptive activity (0.07143 ± 0.07143) against MO-induced nociception which was significantly reverted by naloxone pre-treatment (3.125 ± 1.302). On the other hand, the antinociceptive effect of HC-030031 remained in spite the injection of naloxone (2.240 ± 1.263). In addition to that, AA, Zym and MPT induced significant writhing responses (43.71 ± 4.43 ; 11.00 ± 2.11 ; 9.00 ± 2.30 ; respectively) which was significantly inhibited with HC-030031(18.75, 37.5 e 75 mg/kg, p.o.) treated mice in all the doses tested (29.07%, 53.35% and 41.59%, in the AA test, 55.85%, 61.03% and 71.20%, in the Zym test, 63.88%, 83.33% and 88.88%, in the MPT induced nociception, respectively to 18.75, 37.5 and 75 mg/kg doses. Eventually, the reduction of cell population in the peritoneal cavity prevented the development of writhing responses in both AA and Zym injected mice, with no effect was visualized on MPT treated mice. We the conclude that, since prostaglandin activates the nociceptor directly, it was shown that HC-030031 inhibits visceral nociception possibly through the stabilization of the neuronal ends. The antinociceptive effect of HC-030031 seems to be independent of the inhibition of inflammatory resident cells, opioid and nitric oxide pathways. This study provides perspective for the effective management of visceral pain through the modulation of TRPA1 channels.

Key words: Transient Receptor Potential Ankirin subtype 1; visceral nociception; hemorrhagic cystitis; HC-030031.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via Ascendente da Nociceção

Figura 2. Tratos Aferentes que Partem do Corno Dorsal e Conduzem a Informação aos Centros de Processamento Cerebrais

Figura 3. Superfamília de Canais Iônicos TRP: Grupo 1 e 2

Figura 4. Desenho Esquemático dos Protocolos Desenvolvidos

Figura 5. Dissecção da Bexiga em Camundongo

Figura 6. Aspecto Macroscópico das Bexigas

Figura 7. Teste de Von Frey Eletrônico

Figura 8. HC-030031 não Possui Efeito Antiinflamatório sobre a Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Figura 9. Observação Macroscópica dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Figura 10. Análise Microscópica dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Figura 11. HC-030031 Apresenta Efeito Antinociceptivo Visceral no Modelo de Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Figura 12. Efeito Antinociceptivo Visceral do Composto HC-030031 Independe de Óxido Nítrico

Figura 13. O L-NAME, mas não o HC-030031, tem Efeito Protetor Contra o Processo Inflamatória Associado a Cistite Hemorrágica Induzido por Ifosfamida

Figura 14. Análise Microscópica do Efeito do HC-030031 e L-NAME na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Figura 15. HC-03003 Apresenta Efeito Antinociceptivo no Modelo de Nocicepção Visceral Induzida por Óleo de Mostrada Intracolônico

Figura 16. Estudo do Envolvimento do Sistema Opióide no Mecanismo de Ação do HC-030031

Figura 17. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Ácido acético (0,6%)

Figura 18. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Zymosan (1mg/animal)

Figura 19. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Misoprostol (1 µg/animal)

Figura 20. Lavagem da Cavidade Peritoneal Abdominal de Camundongos Reduz a População de Células Residentes

Figura 21. Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol

Figura 22. Efeito Antinociceptivo do Composto HC-030031 sobre a Nocicepção Induzida por Prostaglandina E2 (PGE₂)

Figura 23. HC-030031 não Possui Efeito Antinociceptivo de Ação Central

Figura 24. HC-030031 não Interfere na Atividade Locomotora Espontânea dos Camundongos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise Macroscópica e Microscópica dos Diferentes Tratamentos do HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Tabela 2 - Análise Macroscópica e Microscópica dos Efeitos do HC-030031 e L-NAME na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Antagonistas do Receptor TRPA1

**Quadro 2. Escores de Edema e Hemorragia Estabelecidos por Gray e Colaboradores
(1986)**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

AA	Ácido acético
AITC	Alil-isotiocianato
ANOVA	Análise de variância
ASICs	Canais Iônicos Ácidos Sensíveis
ATP	Adenosina Trifosfato
CH	Cistite Hemorrágica
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CMC	Carboximetilcelulose
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro Padrão da Média
g	Gramas (s)
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina Eosina
IFO	Ifosfamida
IL-1 β	Interleucina 1-beta
i.pl.	Intraplantar
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilograma (s)
K ⁺ _{ATP}	Canais de Potássio ATP-dependentes
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester
L	Litro (s)
m	Metro (s)
min	Minuto (s)
mg	Miligrama (s)
mm ²	Milímetro (s) ao quadrado
mm	Milímetros
mL	Mililitro (s)
MPT	Misoprostol
n	Número
NMDA	N-metil-D-aspartato
NK	Neurocinina
NK-1	Neurocinina -1
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBS	Solução Salina Tamponada
p	Nível de Significância
pH	Potencial hidrogeniônico
PUV	Peso Úmido Vesical
SP	Substância P
PG	Prostaglandina (s)
PGE ₂	Prostaglandina E2
SAL	Salina
s	Segundo (s)
s.c.	subcutâneo

SNC	Sistema Nervoso central
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina, subtipo-1
TRPC	Receptor de Potencial Transitório Canônico
TRPML	Receptor de Potencial Transitório Mucolipina
TRPM	Receptor de Potencial Transitório Melastatina
TRPN	Receptor de Potencial Transitório Não sensível a estímulo mecânico
TRPP	Receptor de Potencial Transitório Policistina
TRPV	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide, subtipo-1
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TTX	Tetrodotoxina
UFC	Universidade Federal do Ceará
vs	Versus
v.o.	via oral
v/v	Volume por Volume
ZYM	Zyosan
\pm	maios ou menos
+	Mais
x	Vezes
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
Δ	Variação
<	Menor
>	Maior
μ	Micro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
μL	Microlitro (s)
μm	Micrometro
nM	Nanomolar
%	Porcentagem
Ca^{+2}	Íon cálcio (s)
Na^{+}	Íon sódio (s)
NaOH	Hidróxido de sódio
Cl^{-}	Íon cloreto (s)
H^{+}	Íon hidrogênio (s)
Nº	Número (s)
° C	Grau centígrado
T	Tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Dor	20
1.2	Definição de Dor	20
1.3	Classificação dos Tipos de Dor	21
1.4	Mecanismo da dor	22
1.4.1	Transdução da Informação Nociceptiva	22
1.4.2	Transmissão da Informação Nociceptiva	23
1.4.3	Modulação da Informação Nociceptiva	27
1.5	Dor Visceral	27
1.6	Mediadores e Hiperalgisia Visceral	28
1.7	Receptor de Potencial Transitório (TRP)	30
1.8	Receptor de Potencial Transitório Subtipo 1 (TRPA-1)	33
1.8.1	Papel do TRPA-1 e TRPV-1 na Nocicepção	34
1.9	Antagonistas do Receptor TRPA1	37
2	OBJETIVOS	39
2.1	Geral	39
2.2	Específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Animais	40
3.2	Drogas e Reagentes	40
3.3	Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais	40
3.4	Soluções e Corantes	42
3.4.1	Soluções	42
3.4.2	Corantes	43
3.5	Protocolo Experimental	44

3.5.1	Indução de Cistite Hemorrágica	45
3.5.1.1	Avaliação Macroscópica	45
3.5.1.2	Avaliação Microscópica	48
3.5.1.3	Determinação do Peso Úmido Vesical	48
3.5.2	Tratamento com HC-030031 e Mesna	49
3.5.3	Teste de Nocicepção Visceral por Von Frey Eletrônico	49
3.5.4	Estudo da Participação do Óxido Nítrico na Nocicepção Visceral	51
3.5.5	Teste de Nocicepção Visceral Induzida por Óleo de Mostarda	51
3.5.6	Estudo do Envolvimento da via Opióide	52
3.5.7	Teste de Contorção Abdominal Induzido por Ácido Acético, Zymosan ou Misoprostol	52
3.5.8	Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol	53
3.5.8.1	Contagem Total e Diferencial do Número de Células	53
3.5.9	Teste da Nocicepção Induzido por PGE ₂	54
3.5.10	Teste da Placa Quente	54
3.5.11	Teste do Campo Aberto	55
3.6	Análise Estatística	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Efeito do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida	56
4.1.1	Peso Úmido Vesical no Tratamento com HC-030031	56
4.1.2	Análise Macroscópica e Microscópica do Efeito do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida	58
4.2	Estudo da Nocicepção Visceral na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida	62
4.2.1	Efeito dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 na Nocicepção Visceral	62
4.3	Estudo da Participação do Óxido Nítrico no Efeito Antinociceptivo Visceral do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzido por Ifosfamida	64
4.3.1	Efeito Antinociceptivo Visceral do HC-030031 Independe de Óxido Nítrico	64
4.3.2	Peso Úmido Vesical no Tratamento com HC-030031 e L-NAME	66
4.3.3	Observação Macroscópica e Microscópica com o Tratamento com HC-030031 e L-NAME	68
5	Efeito do HC-030031 na Nocicepção Visceral Induzida por Óleo de Mostarda	

	Intracolônico	71
6	Estudo do Efeito do HC-030031 na Nocicepção Visceral Induzido por Óleo de Mostarda e a Participação do Sistema Opióide	73
7	Estudo da Atividade Antinociceptiva Visceral do HC-030031 e a Participação das Células Peritoneais Residentes	75
7.1	Efeito do HC-030031 no Modelo de Contorções Abdominais Induzida por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol	75
7.2	Efeito da Depleção das Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol	79
8	Efeito Antinociceptivo do composto HC-030031 sobre a Nocicepção Induzida por Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	82
9	Avaliação do Potencial Antinociceptivo do HC-030031 no Teste de Nocicepção Térmico na Placa Quente	84
10	Estudo do Efeito do HC-030031 na Locomoção dos Animais	86
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO

1.4 Dor

1.2 Definição de Dor

O conselho da IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) em sua reunião anual, locada em Kyoto em novembro de 2007, aprovou a publicação de modificações na terminologia básica de dor da IASP em seu “*website*”. Estas modificações foram preparadas pela chamada força tarefa em taxonomia da IASP, e revisada por todo o corpo editorial de seu jornal, o periódico “*Pain*”. A terminologia sobre dor idealizada em 2008 provocou grandes discussões entre clínicos e pesquisadores, foi concluído que a definição a seguir é bastante útil e apropriada (LOESER & TREEDE, 2008): A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (IASP, 2008).

A percepção corporal da dor é denominada nocicepção, termo fisiológico usado para descrevermos o processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOESER & TREEDE, 2008).

Basbaum e colaboradores descrevem a nocicepção como um processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009).

Ferreira e colaboradores vêm trabalhando com uma forma mais simplificada dessa definição, considerando a dor como uma “**percepção desagradável de uma sensação nociceptiva**” (CUNHA, 2008). Este conceito envolve dois componentes da dor, a nocicepção e a sua percepção. A nocicepção (do latim “**nocere**” significa: ferir), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiência de vida de cada pessoa. A partir dessas considerações, dor seria o termo mais adequado quando se refere ao ser humano, enquanto nocicepção seria mais indicado para animais na experimentação animal, uma vez que não se entende a percepção nos mesmos (NOBACK et al., 1996).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED) a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento de suas vidas e, em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia (SBED, 2009). Constitui a principal causa de sofrimento e incapacitação para o trabalho ocasionando graves conseqüências psicossociais e econômicas levando ao absenteísmo de cerca de 40% dos indivíduos. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado em grandes proporções nos últimos anos (SBED, 2009).

1.3 Classificação dos Tipos de Dor

A dor pode ser classificada temporalmente em dois grandes grupos: dor aguda, de curta duração com patologia identificável e dor crônica, de longa duração com associação com uma patologia que pode ou não ser evidente (BEERS, 2003).

A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo. Contudo, freqüentemente a dor torna-se crônica e debilitante em substituição a sua função de atuar como um sistema de aviso. A transição para a fase crônica envolve mudanças na medula espinhal e encéfalo, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas ao nível do neurônio sensorial primário (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A sensação dolorosa é uma sensação subjetiva e multidimensional que envolve aspectos sensitivos, prazerosos e culturais evocando reações físicas e emocionais que podem ser atenuadas, acentuadas ou perpetuadas por variáveis sócio-culturais, orgânicas e psíquicas dos indivíduos e por condições ambientais que se apresentam. Quanto aos mecanismos neurofisiológicos a dor pode ser classificada em dor nociceptiva quando as vias nociceptivas encontram-se preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores de tecidos cutâneos (dor somática) ou profundos (dor visceral) (BEERS, 2003). Já dor neuropática, é aquela que as vias nociceptivas apresentam alterações na estrutura e ou função, resultante de lesão seletiva do trato neo-espinotalâmico (dor central) ou resultante de lesões no sistema nervoso periférico (dor periférica) (BEERS, 2003). Existe ainda a dor psicogênica, quando nenhum mecanismo nociceptivo ou neuropático pode ser identificado e há sintomas psicológicos suficientes para o estabelecimento de critérios psiquiátricos na classificação DSM-IV (Manual Estatístico e Diagnóstico de Desordens Mentais-IV) (TURK & RUDY, 1992; BEERS, 2003; PRUDENTE, 2004; LOESER & TREEDE, 2008).

1.4 Mecanismo da Dor

Dor é uma sensação que compreende três mecanismos básicos: **Transdução**, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nódico (mecânico, químico e térmico) em potencial de ação; **Transmissão**, que é um conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso gerado no nociceptor, seja conduzido ao sistema nervoso central (SNC) e; **Modulação**, vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTH, 2004).

Os receptores da dor (nociceptores) na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON, 1997).

1.4.1 Transdução da Informação Nociceptiva

Muitos passos podem ser identificados no processamento neural dos sinais nocivos que levam a experiência de dor. O primeiro, na seqüência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a **transdução**, ou seja, a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transmitidos para o sistema nervoso central (SNC) (BESSON & PERL, 1969). As fibras nociceptivas aferentes são neurônios tipicamente pseudounipolares, com terminações periféricas e centrais. Neurotransmissores que são produzidos dentro do corpo celular (por exemplo, no gânglio da raiz dorsal) são liberados por terminações das fibras nervosas tanto periféricas quanto centrais. Dessa forma, estes neurotransmissores participam na produção do sinal doloroso periféricamente, bem como na promoção de eventos que levam as percepções centrais (SCHMELZ & PETERSEN, 2001).

A dor pode resultar da ativação de nociceptores periféricos e da liberação de neurotransmissores, bem como pela diminuição no limiar da resposta da fibra nociceptiva e nociceptores circundantes (nociceptores de sensibilização). Além disso, nociceptores silenciosos, os quais normalmente não são ativos, são recrutados após algum dano tecidual e podem então, responder a uma variedade de estímulos (MEYER et al., 1991; HANDWERKER et al., 1991). Uma vez ativados, estes nociceptores previamente silenciosos se tornam sensibilizados e respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa (o mesmo estímulo produz mais dor) (VANDERAH, 2007). O aumento da sensibilidade a dor é

denominada de hiperalgesia. Esta, normalmente é decorrente de importantes mudanças inicialmente no processo periférico e posteriormente, no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodínia, que é a dor frente a um estímulo não lesivo. A alodínia é mediada pela ativação periférica de receptores táteis que ganham acesso ao processamento nociceptivo central (LOESER & TREEDE, 2008).

Os estímulos nocivos (ou nociceptivos), físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (bradicinina, capsaicina, serotonina, prótons etc.), são detectados por nociceptores presentes nos diferentes tecidos. Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não mielinizadas, de uma família específica de neurônios sensoriais primários. O termo nociceptor também é comumente utilizado para definir o neurônio nociceptivo primário como um todo, não apenas as suas terminações nervosas livres. Os nociceptores são neurônios pseudo-unipolares, possuindo um ramo axonal distal, que se dirige à periferia, e outro ramo axonal proximal, que se dirige ao corno dorsal da medula espinal ou tronco cerebral. Eles inervam amplamente a pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras (revisado por BESSON; CHAOUCH, 1987; JULIUS; BASBAUM 2001).

A fibra nervosa aferente primária detecta estímulos ambientais (de natureza térmica, mecânica ou química) e converte em corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Na última década, muitas moléculas de transdução da nocicepção têm sido identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos receptores de potencial transitório (TRP) (CHENG & JI, 2008; PATAPOUTIAN et al., 2009; WOOLF et al., 2007). Esses canais participam na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2007).

1.4.2 Transmissão da Informação Nociceptiva

O segundo estágio no processamento dos sinais nociceptivos é a **transmissão**. Os nociceptores têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal, onde são retransmitidas mensagens através da liberação de mediadores como: glutamato, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (JEFTINIJA et al., 1991; LAWSON et al., 1997; LAWSON et al., 2002). A informação do estímulo nocivo é transmitida principalmente através de dois

diferentes tipos de neurônios nociceptivos aferentes primários, que conduzem o estímulo em diferentes velocidades.

Baseado em critérios morfológicos, as fibras nociceptivas podem ser classificadas em fibras de pequeno e médio diâmetro. As fibras de médio diâmetro, também denominadas fibras A δ , são finamente mielinizadas e possuem velocidades de condução entre 2 e 30 m/s. Elas correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras de pequeno diâmetro, também denominadas fibras C, não são mielinizadas e por isso são de velocidade de condução baixa (0,5 a 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa (revisado por MILLAN 1999; JULIUS & BASBAUM 2001). Elas correspondem a 80% das fibras condutoras da informação nociceptiva. Também existem diferenças quanto ao tipo de estímulo nociceptivo capaz de ativar essas fibras. Enquanto as fibras A δ respondem, principalmente, a estímulos mecânicos e térmicos, as fibras C são ditas polimodais e respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (revisado por JULIUS & BASBAUM 2001). As fibras C também têm sido implicadas na transmissão de estímulos responsáveis pelo prurido (JOHANEK et al., 2008).

As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 2 e 30 m/s (MILLAN 1999; WALL & MELZACK 1999; JULIUS & BASBAUM 2001). As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade bastante lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (PLEUVRY & LAURETTI 1996; MILLAN 1999; JULIUS & BASBAUM 2001). Estas fibras aferentes fazem sinapse em um neurônio de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (**Figura 1**). O neurônio de segunda ordem cruza a medula espinhal até a porção contralateral e ascende pelo trato espinotalâmico até alcançar o tálamo. No tálamo neurônios de terceira ordem são ativados, levando a informação do estímulo doloroso até o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor (**Figura 2**) (VANDERAH, 2007).

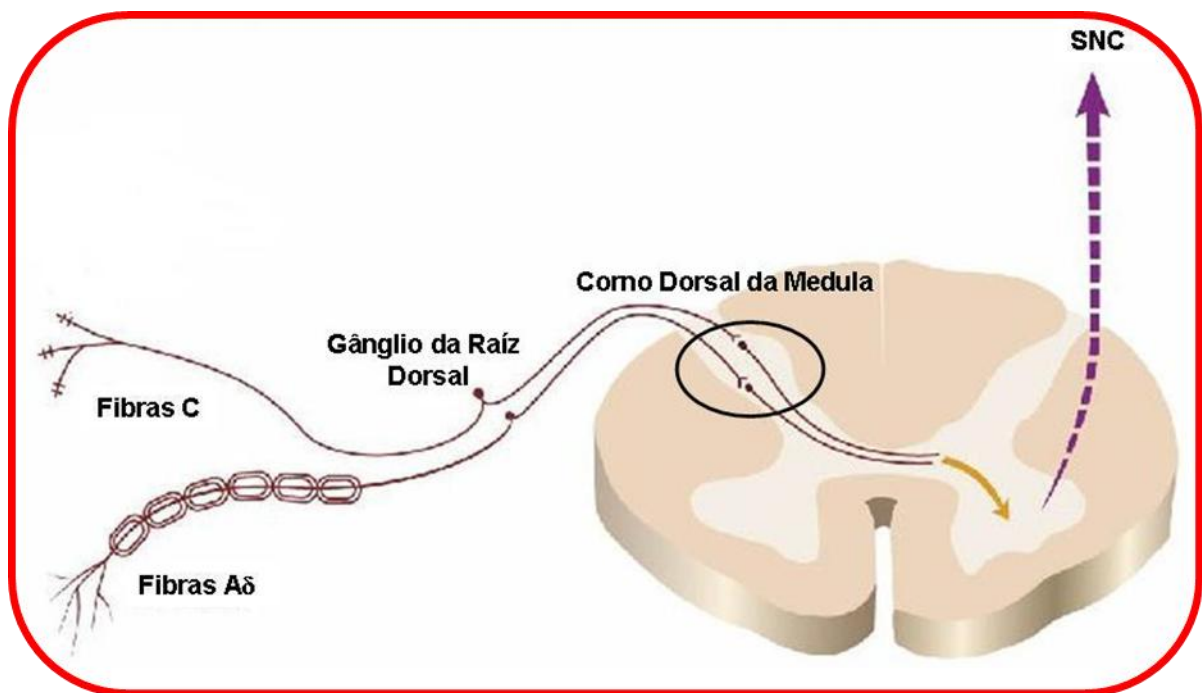


Figura 1: Via Ascendente da Nocicepção – primeira sinapse. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A δ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula. Fonte: FREITAS, 2009.

As células de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal também têm a capacidade de modificar os padrões de resposta no caso de uma descarga sustentada das fibras aferentes (como poderia ocorrer no estabelecimento de uma lesão). Nestas circunstâncias, os neurônios de segunda ordem se tornam sensibilizados e isso é chamado de sensibilização central que também contribui aos fenômenos de hiperalgesia e alodínia (LA MOTTE et al., 1991).

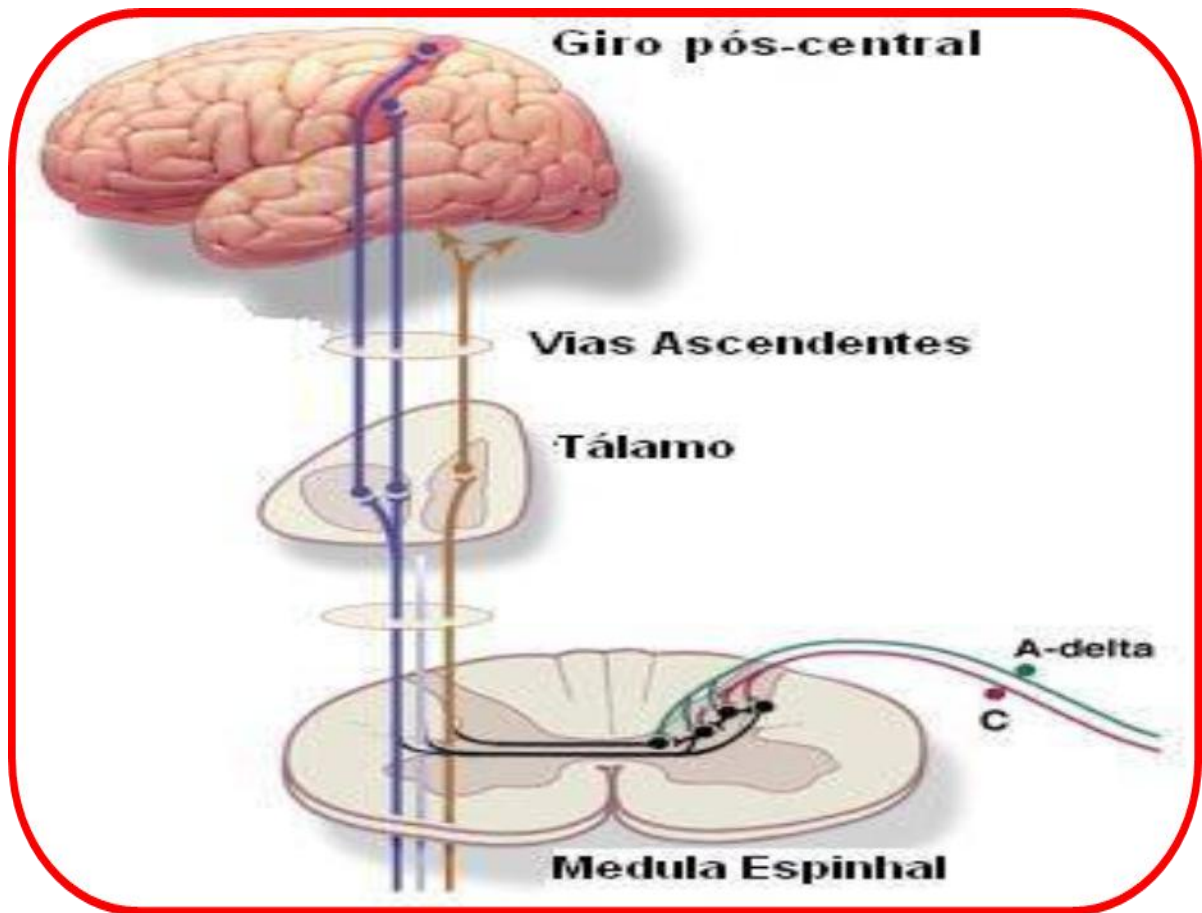


Figura 2: Tratos Aferentes que Partem do Corno Dorsal e Conduzem a Informação aos Centros de Processamento Cerebrais (Principal via ascendente da nocicepção). Fonte: Machado, 1988.

Quando as fibras nociceptivas aferentes chegam ao corno dorsal da medula espinhal, elas transmitem o sinal originado na periferia através da liberação de neurotransmissores específicos que estão associados com a dor. Um dos neurotransmissores mais importantes é o glutamato, que pode interagir com receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e não NMDA. Outro importante transmissor associado à transmissão da dor é a substância P (SP), que interage com receptores da família das taquicininas acoplados a proteína G (VANDERAH, 2007).

1.4.3 Modulação da Informação Nociceptiva na Medula Espinhal

A **modulação** é o terceiro aspecto do processamento do estímulo nocivo. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso em resposta a estímulos nocivos e permitem que sinais nocivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos, modificando assim a transmissão do sinal para centros superiores. O sistema de modulação endógeno da dor consiste de inter-neurônios bem definidos dentro das camadas superficiais da medula espinhal e tratos neuronais descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006).

Mesmo com tantos conhecimentos acerca da dor, pela sua natureza, é difícil de determinar, investigar, conduzir e tratar este sintoma que acompanha inúmeras doenças (TRACEY & MANTYH, 2007).

1.5 Dor Visceral

A dor visceral é uma das formas mais comuns de dor produzidas por um estado patológico (angina, cólica, dispepsia, dismenorréia, etc.) e uma das razões mais frequentes pela qual um paciente busca auxílio médico. Não existe, entretanto, um protocolo bem estabelecido para a abordagem diagnóstica e, na maioria das vezes, essa investigação se torna uma prática médica onerosa e invasiva (KRAYCHETE & GUIMARÃES 2003).

A dor visceral pode ser considerada como parte das reações de defesa do organismo contra estímulos nocivos, particularmente daqueles que tenham repercussões sobre a mucosa dos órgãos ocos. É um problema de relevância clínica considerável, e os seus mecanismos neurobiológicos diferem da dor neuropática nociceptiva ou somática (CERVERO & LAIRD 1999).

Vários estímulos provocam dor naturalmente nos órgãos viscerais embora a partir de uma perspectiva experimental os estímulos adequados para a produção de dor em doenças viscerais não são totalmente compreendidos. Estímulos que provocam respostas naturais também são indicativos de dor visceral. Um grande desafio para entender a dor visceral é fazer referência entre a localização da dor e a fonte do estímulo nocivo. Outro desafio importante é entender as propriedades funcionais dos nociceptores viscerais que desencadeiam processos centrais de estados de dor (CERVERO; LAIRD, 1999).

A dor visceral resulta da ativação de fibras sensoriais aferentes que inervam órgãos internos e é descrito em termos de cinco características clínicas (CERVERO; LAIRD, 1999): 1) Não tem origem em todos os órgãos viscerais, uma vez que nem toda víscera é inervada por receptores sensoriais ou pela falta de um estímulo nódico apropriado; 2) Não está sempre relacionada a uma lesão, e sim às propriedades funcionais e não estruturais da dor visceral; 3) É referida na parede do corpo o que pode ser explicado pela convergência central das vias viscerais e somáticas; 4) É difusa e pouco localizada como consequência da baixa densidade de terminais aferentes periféricos, compensados pela divergência central das vias aferentes e 5) É geralmente acompanhada por acentuados reflexos motores e autonômicos, o que é conhecido como reação do sistema de alerta (CERVERO; LAIRD, 1999).

Muito progresso foi feito nos últimos anos na compreensão das propriedades funcionais dos nociceptores viscerais que provocam estados de dor, seus mecanismos moleculares de ativação e sensibilização sobre as suas ações centrais. Alguns alvos moleculares têm sido identificados como os principais intervenientes na ativação e sensibilização de nociceptores viscerais, nomeadamente CIAS (canais iônicos ácidos sensíveis), canais de sódio tetrodotóxina (TTX) resistentes e o receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1) (CERVERO & LAIRD; 2004). Alguns elementos não neurais dos órgãos viscerais, como o urotélio, demonstraram desempenhar um papel ativo na transdução de eventos sensoriais viscerais por mecanismos que envolvem a liberação de adenosina trifosfato (ATP) pelas células uroteliais. Alguns neurotransmissores conhecidos, tais como a família taquicinina de neuropeptídeos, provavelmente desempenham um papel importante na ativação periférica e central de vias nociceptivas viscerais aferentes e na geração da hiperalgesia visceral (CERVERO & LAIRD; 2004).

Diversos estímulos têm sido empregados no estudo da dor visceral e podem ser categorizados em quatro grupos: estímulos elétricos, estímulos mecânicos, isquemia e estímulos químicos (NESS, 1999).

1.6 Mediadores e Hiperlgesia Visceral

A sensibilização periférica dos principais terminais dos neurônios aferentes localizados em um órgão visceral resulta de substâncias químicas e/ou estímulos mecânicos que reduz o limiar de ativação e aumentam a frequência de descargas neuronais em resposta a

um determinado produto químico ou estímulo mecânico. A maioria dos mediadores liberados no local da lesão são algogênicos e pró-inflamatórias, e contribuem para a sensibilização periférica (MARQUES, 2004).

A sensibilização periférica resultante de longos períodos de estimulação libera também pelo menos dois mediadores centrais neurais, glutamato e substância P (SP) que aumentam a eficácia da transmissão sináptica entre os neurônios aferentes primários e espinhal. Este efeito é chamado de sensibilização central (BUÉNO et al., 2000; DICKENSON, 1995). O glutamato é um importante transmissor da medula espinhal, e o N-metil-D-aspartato (NMDA) subtipo de receptor de glutamato foi proposto para ter um papel particular na mediação da hiperalgesia e dor persistente (LAIRD et al., 1995). Além disso, a SP e o receptor NK1 (neurocinina) pode ser de particular importância na dor visceral persistente, especialmente com um componente neurogênico. A sensibilização pode ocorrer por causa de um sinergismo entre a SP e receptores NMDA que induzem a sensibilização central (DRY & URBAN; 1996). O aumento da resposta dos neurônios do corno dorsal da inflamação crônica é largamente mediada por receptores NMDA ativados. Essa ativação de receptores NMDA depende da proteína C quinase, particularmente da regulação da fosforilação da quinase extracelular. A ativação de receptores NK por SP provoca ativação da proteína C quinase, que induz a fosforilação dos receptores NMDA. Como resultado, o bloqueio de magnésio, que precisa ser liberado para ativar os receptores NMDA, é anulado e permite que os receptores NMDA para operar mais próximo do potencial de membrana em repouso (MILLAN, 1999). Todos esses dados sugerem fortemente que os receptores para SP e neurocinina 1 (NK-1) são cruciais para a indução da sensibilização central em roedores.

Substâncias químicas, denominadas genericamente de substâncias algogênicas, surgem em grandes quantidades nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos. Algumas são de produção local, como a serotonina, bradicinina (BK), histamina, citocinas, produtos derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, por ativação das vias ciclooxigenases e lipooxigenases. Outras são produzidas antidromicamente (no sentido inverso da transmissão dos nervos sensitivos, isto é, do corpo neuronal para a periferia), sendo as mais importantes a SP e o CGRP. Esse processo de sensibilização local fisiológico é denominado de hiperalgesia primária. Essa grande quantidade de mediadores químicos leva à redução do limiar de sensibilidade e aumento da sensibilidade das terminações nervosas vizinhas. É criado um processo de hiperalgesia que se estende progressivamente às regiões envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial. Os estímulos desencadearão dor generalizada por estímulos dos nociceptores, que se

tornam sensíveis a estímulos de baixa intensidade como, por exemplo, estímulos táteis, levando a uma dor “patológica”. Isso caracteriza a hiperalgesia secundária (MARQUES, 2004).

Os mastócitos são derivados de precursores presentes na medula óssea. São conhecidos por participar de processos alérgicos e em reações de hipersensibilidade do tipo I (GALI, 1993). Os mastócitos também estão associados a muitas condições patológicas em que a dor é o sintoma predominante. A cistite intersticial e a síndrome do intestino irritável são exemplos. Em ambas as condições, um aumento no número de mastócitos tem sido descritos da bexiga (BÁRBARA et al., 2004) e no intestino (THEOHARIDES et al., 1998).

Alguns estudos descrevem um aumento na regulação desses canais iônicos TRP, cuja função tem sido estudada *in vitro* em células neuronais, verificando-se que a sensibilização destes constitui um mecanismo importante para o desenvolvimento da hiperalgesia crônica (ALESSANDRI-HABER et al., 2006; ALESSANDRI-HABER et al., 2003; PARK et al., 2006; TODAKA et al., 2004; TOMINAGA et al., 2004; TYMPANIDIS et al., 2004), hiper-responsividade brônquica (LIEDTKE et al., 2004), bexiga neurogênica (APOSTOLIDIS et al., 2005) e inflamação neurogênica (GREPPETTI et al., 2004; MATTHEWS et al., 2004; NATHAN et al., 2002; PLANELLS-CASES et al., 2005; YIANGOU et al., 2001).

1.7 O Receptor de Potencial Transitório

Os receptores de potencial transitório (TRP) são uma superfamília de canais iônicos formados por seis domínios transmembrana permeáveis a cátions, principalmente cálcio (NILIUS et al., 2007).

A história dos TRP começa na década de 1960, quando Cosens e Manning (1969) descreveram pela primeira vez a existência de uma variante mutante de *Drosophila melanogaster* que se apresentava cega. Analisando seu sistema visual, foi observado que o fotorreceptor apresentava uma resposta transitória à estimulação luminosa prolongada, enquanto que o fotorreceptor normal apresentava uma resposta contínua. Vinte anos após esta descoberta, os pesquisadores Montell e Rubin (1989) descreveram a presença de uma proteína composta por 1275 aminoácidos dispostos em aproximadamente oito segmentos transmembrana, sem homologia a outros receptores descritos até então. Posteriormente foi encontrado o gene que codificava esta proteína, denominado *trp-like* (*trp-l*), e observaram que esta proteína apresentava homologia com a região do sensor de voltagem de alguns canais de cálcio,

indicando que este gene codificava subunidades de um canal permeável a cálcio (PHILLIPS et al. 1992).

A primeira homologia para o TRP descrito em vertebrados foi feita na década de 1990, quando Peterson e colaboradores (1995) descreveram a existência de TRP em oócitos de *Xenopus* e também em camundongos. Posteriormente, Wes e colaboradores (1995) também identificaram uma proteína homóloga ao TRP em humanos, e este foi denominado TRPC1 (canônico). Esta primeira descoberta impulsionou a pesquisa por outras proteínas e canais homólogos do TRP em humanos e outras espécies. Foram descritos isoformas TRP em 29 vertebrados, divididos inicialmente em três subfamílias (C – canônico V - vanilóide e M – melastatina (HARTENECK et al., 2000), e posteriormente em outras 4 subfamílias (P – policistina, ML – mucolipina, A – anquirina, N – não sensível a estímulo mecânico C; CLAPHAM, 2003).

A superfamília de canais TRP é dividida em dois grupos (MONTELL, 2005; PHELPS & GAUDET, 2007) sendo o grupo 1 dividido em 5 subfamílias (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA e TRPN) e o grupo 2 em duas subfamílias (TRPP e TRML) (**Figura 3**) (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). Essa divisão é baseada segundo suas seqüências e diferenças topológicas (MONTELL; RUBIN 1989). O grupo 1 carrega uma forte seqüência homológica e a maior região abrange os seis segmentos transmembrana incluindo o poro que é formado entre o quinto e sexto segmento (MONTELL et al., 2002). Já o grupo 2 compartilham em suas proteínas uma diferença na seqüência homóloga dos segmentos transmembrana e também contém uma longa alça de aminoácidos entre o primeiro e o segundo domínio transmembranar (PALMER et al., 2005).

Os receptores de potencial transitório (TRP) são uma família de canais iônicos com a capacidade de permear cátions, principalmente cálcio. Apesar das teorias iniciais descreverem a existência de oito domínios transmembrana, técnicas de imagem de microscopia eletrônica e bioquímicas demonstraram que na verdade, os canais TRP são formados por seis domínios transmembrana com a região formadora do poro entre as regiões cinco e seis, e a região sensor de voltagem entre as regiões um e quatro (revisado por LATORRE et al., 2009). A cauda C e N terminal apresentam-se voltadas para o lado intracelular, com caráter fortemente hidrofóbico (**Figura 3**) (GAUDET, 2009).

A região C terminal apresenta variação dentre os diferentes tipos de canais TRP, apresentando diferentes sítios e também uma região conservada (domínio TRP). Esta última região apresenta-se conservada em 11 das 13 isoformas conhecidas em mamíferos atualmente, sendo utilizada como marcador para o rastreamento destes canais (MONTELL, 2005).

A região N terminal apresenta-se formada por uma série de resíduos de anquirina, presente na maioria dos canais TRP. Estes resíduos estão dispostos como tijolos empilhados, formando uma superfície estável e rígida para o acoplamento de diversas proteínas ao receptor. Além disso, estes domínios servem como âncoras para o trânsito do receptor de vesículas até a membrana plasmática, e também para a sua estabilização entre a mesma e o citoesqueleto celular. Para alguns receptores, como os TRPV, alterações nesta região implicam em uma não funcionalidade do mesmo (MONTELL, 2005).

A maioria dos TRP age como sensores fisiológicos a estímulos externos, sejam estímulos térmicos, químicos (variações de pH e osmolaridade), sonoros ou luminosos. Apesar disso, também são capazes de responder a uma gama de substâncias endógenas como lipídios, nucleotídeos, produtos do estresse oxidativo e açúcares (JARA-OSEGUERA et al., 2008). Apesar dessas diferenças, os canais TRP, com exceção do TRPM4/5, possuem como função controlar a concentração de cálcio (Ca^{+2}) intracelular. Com isso, a ativação destes canais leva a ativação de uma série de enzimas sensíveis a cálcio, como óxido nítrico sintase (NOS) e outras enzimas do tipo quinase, bem como transcrição gênica (TAI et al., 2008).

Apesar de se localizarem principalmente na membrana celular, alguns TRP podem ainda ser encontrados em algumas organelas, como retículo endoplasmático e mitocôndria (NELSON et al., 2010)

Os TRP receberam esse nome, devido, a sua ativação, permitirem o influxo abundante de cargas positivas, para a célula, gerando uma despolarização transitória, chamada de potencial receptor, podendo ou não vir gerar um potencial de ação. Esses receptores tem atraído, uma crescente atenção por serem os únicos canais de entrada de cálcio ativados por uma variedade de estímulos e associados a diversas funções fisiológicas (CLAPHAM, 2003).

Os canais TRP participam da fisiologia sensorial, atuando na visão, audição, paladar, olfato, tato, sensações térmicas e osmosensações (VENKATACHALAM, 2007) agindo como sensores celulares que respondem a estímulos físicos, mecânicos e químicos (CLAPHAM, 2003; NILIUS et al., 2005a; PHELPS; GUADET, 2007).

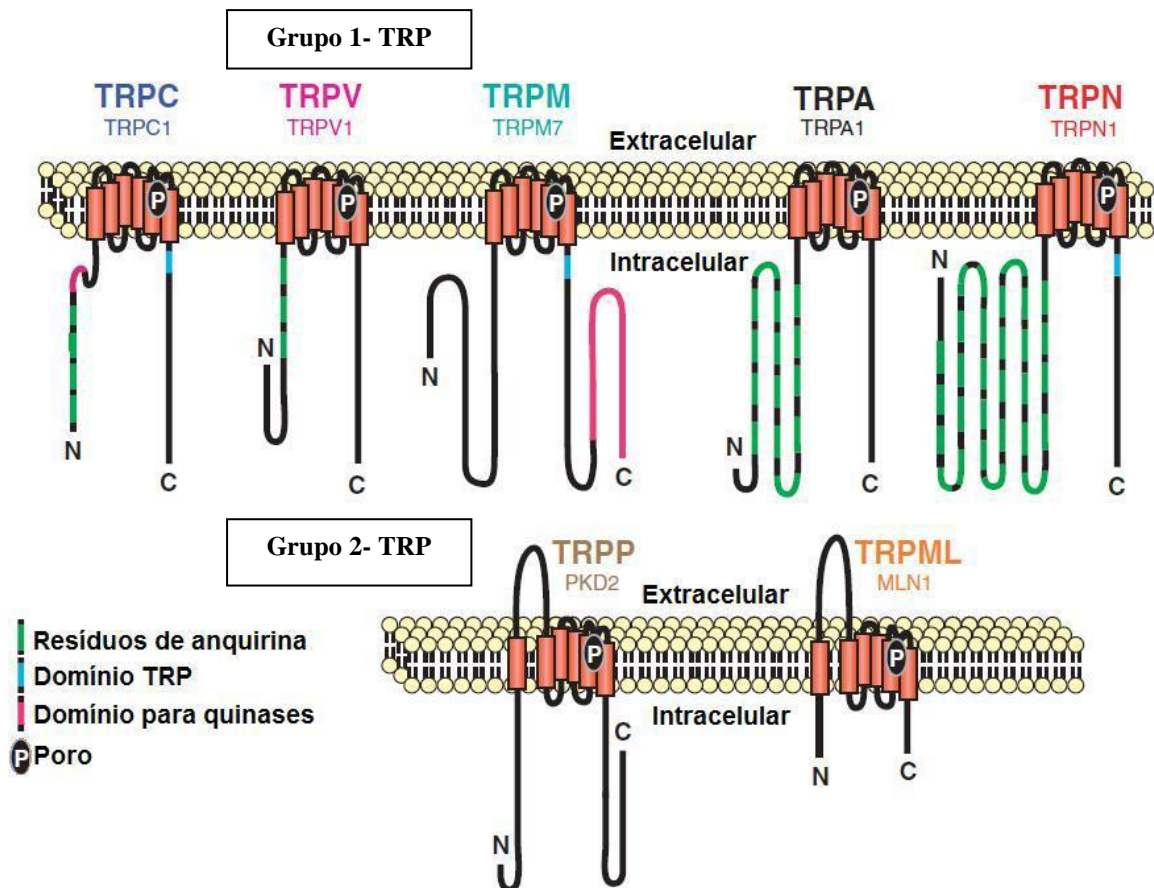


Figura 3. Superfamília de Canais Iônicos TRP: **Grupo 1** (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA e TRPN) possuem a maior região entre os domínios C e N abrangendo os seis segmentos transmembranares incluindo o poro entre o 5º e 6º segmentos e **Grupo 2** (TRPP e TRPML) possuem longa alça transmembranares entre o 1º e 2º domínio. **Fonte:** Modificado de Montrell, 2005.

1.8 O Receptor de Potencial Transitório Subtipo 1 (TRPA-1)

O receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1) pertence à subfamília de receptores de potencial transitório (TRP). É um canal iônico não seletivo que está primariamente expresso em neurônios nociceptivos de pequeno diâmetro (STORY et al., 2003; KATSURA et al., 2006; HJERLING-LEFFLER et al., 2007), sendo ativado a 17° C, que se aproxima do limiar do frio nocivo para humanos a 15° C (STORY et al., 2003). Quando é ativado, provavelmente contribui para a percepção de estímulos dolorosos e

hiperalgesia inflamatória (BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al., 2006; MCNAMARA et al., 2007).

Múltiplos mecanismos convergem para regular as funções do TRPA1 que pode ser ativado por mediadores inflamatórios de maneira indireta através da fosfolipase C e proteína quinase C (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004), ou diretamente por cálcio intracelular (DOERNER et al., 2007; ZURBORG et al., 2007) ou por componentes derivados de plantas como carvacrol (XU et al., 2006) e delta-9-tetrahydrocannabinol (JORDT et al., 2004). Além disso, recentes estudos têm descrito um novo mecanismo através do alil-isotiocianato (AITC) e outros irritantes eletrofílicos que podem ativar o TRPA1 por modificações covalentes nos resíduos de cisteína na porção N-terminal citosólica do canal (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007).

O TRPA1 é ativado por vários irritantes que causam dor, incluindo o AITC (JORDT et al., 2004) e alicina (MACPHERSON et al., 2005; BAUTISTA et al., 2005), os ingredientes pungentes na mostarda e extratos de alho, respectivamente como também α,β -aldeídos não saturados e a acroleína poluente do ar que medeiam as ações irritantes (BAUTISTA et al., 2006). Neurônios sensoriais de camundongos deficientes para TRPA1 mostram grande diminuição das respostas para cada um desses componentes, demonstrando que o canal TRPA1 é o sítio molecular primário através dos quais ativam as vias para a dor (BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al., 2006).

1.8.1 O Papel do TRPA-1 e TRPV-1 na Nocicepção

Em modelos experimentais, a ativação do TRPA1 por compostos que causam dor e inflamação neurogênica pode ser bloqueada por tratamentos com antagonistas seletivos ou oligonucleotídeos antissenso específicos para TRPA1 (OBATA et al., 2005; MCNAMARA et al. 2007; PETRUS et al. 2007; TREVISANI et al., 2007). Além disso, animais nocaute para TRPA1 (TRPA1^{-/-}) apresentam deficiência das funções sensoriais e de resposta à nocicepção causada pela BK (BAUTISTA et al. 2006; KWAN et al., 2006).

Em outro estudo, camundongos TRPA1^{-/-} mostraram uma redução dos comportamentos para estímulos mecânicos, frio e químicos. O TRPA1 foi considerado um candidato a mecanosensor e que responde a estímulos químicos e térmicos (SHUQI Du et al., 2008).

Eid e colaboradores (2008) demonstraram que o HC-030031, um antagonista seletivo do TRPA1, efetivamente inibe a hipersensibilidade mecânica em modelos de nocicepção inflamatória e neuropática, sugerindo um papel importante na transmissão nociceptiva. Tal observação provém perspectiva para o desenvolvimento de possíveis drogas analgésicas direcionados contra esse alvo (EID et al., 2008).

Baseado em estudos de expressão heteróloga foi proposto que o TRPA1 funciona como um canal operado por receptor, despolarizando nociceptores em resposta a agentes proalgésicos ou inflamatórios, tais como BK, ATP, monoaminas e neurotrofinas, que ativam vias de sinalização envolvendo a fosfolipase C (BANDELL et al, 2004;. JORDT et al., 2004), PKA e receptor ativado por protease 2 (PAR2) (DAI et al., 2007; WANG et al., 2008).

O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), originalmente chamado de receptor vanilóide 1 (VR1) é comumente referido como receptor da capsaicina, foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos: compostos vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) e pH baixo ($< 5,9$) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Desde então, tem sido relatado que o TRPV1 é ativado pela cânfora, alicina, óxido nítrico, toxinas de aranha e mediadores lipídicos como endovanilóides (anandamida) e produtos da lipoxigenase (leucotrieno B₄, LTB₄); potencializado pelo etanol, nicotina e citocinas próinflamatórias e modulado por cátions extracelulares (ZYGMUNT et al., 1999; HWANG et al., 2000; TREVISANI et al., 2002; LIU et al., 2004; AHERN et al., 2005; MACPHERSON et al., 2005; XU, BLAIR, CLAPHAM, 2005; MACPHERSON et al., 2006; SIEMENS et al., 2006; YOSHIDA et al., 2006). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando diferentes mediadores inflamatórios como BK, glutamato, prostaglandinas E₂ (PGE₂) ou fator de crescimento do nervo (NGF) são capazes de sensibilizar e estimular o TRPV1 indiretamente através da ativação da fosfolipase C (PLC), com conseqüente ativação da proteína quinase C (PKC) ou da fosfolipase A₂ (PLA₂), culminando com a ativação da proteína quinase A (PKA) (CHUANG et al., 2001; HU, BHAVE, GEREAU, 2002; FERREIRA, DA SILVA, CALIXTO, 2004). Estudos indicam que a BK induz hiperalgesia térmica através da sensibilização do TRPV1 (CHUANG et al., 2001).

Sugere-se que o TRPV1 é sempre coexpresso com TRPA1, o que levanta a possibilidade de que exista uma cooperação entre o TRPV1 e o TRPA1 ativando nociceptores em resposta à BK (BAUSTISTA et al., 2006). TRPA1 é seletivamente expresso por um subconjunto de nociceptores não mielinizados peptidérgicos que também expressam TRPV1,

coerentes com a sua participação nesta via de sinalização (BAUTISTA et al, 2005; STORY et al, 2003).

O papel do TRPV1 na dor aguda e crônica tem sido estabelecido pelo uso de antagonistas do receptor TRPV1 e camundongos TRPV1 nocautes (WALKER et al., 2003). A dessensibilização induzida por agonistas do receptor TRPV1 apontam para a sua utilização na supressão da dor neuropática, enquanto que antagonistas TRPV1 são agentes poderosos no tratamento da dor inflamatória, pós-operatória e artrite (LOPEZ-RODRIGUEZ et al., 2003; EL KOUHEN et al., 2005).

Além da BK, demonstrou-se também, através de evidências genéticas, que a ação nociceptiva periférica do óxido nítrico é mediada por ambos os receptores TRPV1 e TRPA1 (MIYAMOTO et al., 2009).

1.9 Antagonistas do Receptor de TRPA1

Bloqueadores dos canais TRP não seletivos, como o vermelho de rutênio e gadolínio são conhecidos por bloquear o receptor TRPA1. Amilorida (NAGATA et al., 2005), cânfora (Xu et al., 2005) e mentol (KARASHIMA et al., 2007) têm sido demonstrados antagonizar o TRPA1 em concentrações na faixa de milimolar. Gentamicina e outros antibióticos são um pouco mais potentes, mas os primeiros bloqueadores seletivos de TRPA1 disponíveis que atuaram sobre o receptor em concentrações na ordem de 1,0 μM foram o HC-030031 (MCNAMARA et al., 2007) e o AP-18 (**Quadro 1**) (PETRUS et al., 2007). Estes têm sido a base para a grande maioria dos estudos farmacológicos em modelo animais *in vivo* tendo como alvo o TRPA1. Outros compostos estruturalmente relacionados, CHEM-5861528 (WEI et al., 2009) e A-967079 (apresentação de REGINA REILLY, 2009), também tem sido relatados (**Quadro 1**). Embora muitos estudos empregando essas ferramentas têm demonstrado a importância do TRPA1 em analgesia, nenhum destes compostos parece ser imediatamente apropriado como uma droga para uso em seres humanos. Um fator que pode contribuir à escassez relativa da utilidade dos antagonistas TRPA1 é o grau de divergência na sequência do TRPA1 entre as espécies (FANGER et al., 2010).

A utilização de um antagonista seletivo é um padrão ouro para sondar a função do receptor TRPA1 *in vivo*. A descoberta de antagonistas TRPA1 seletivos tem permitido a realização de estudos que tratam da investigação do papel do TRPA1 em animais saudáveis bem como em vários modelos de doença em animais. Notáveis diferenças na farmacologia do

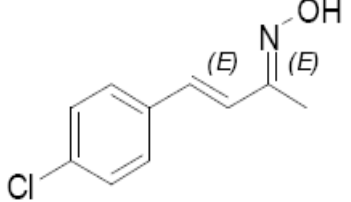
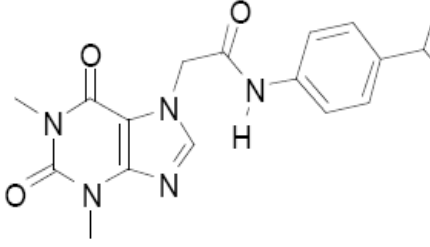
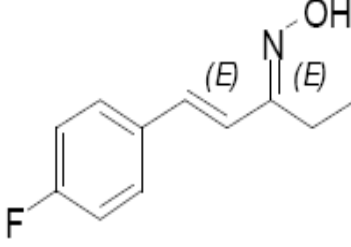
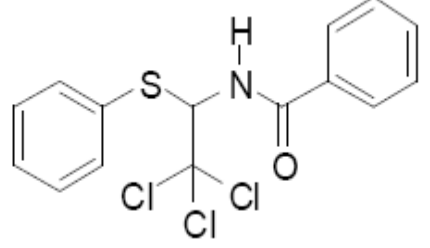
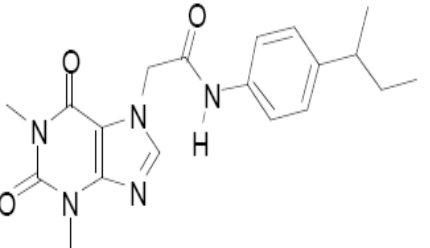
TRPA1 estão bem documentados (CHEN & KYM 2009). Portanto é importante validar os antagonistas do TRPA1 como ferramentas farmacológicas em cada espécie a serem estudadas

Um antagonista seletivo do TRPA-1, a molécula AP-18, foi avaliado quanto à capacidade de atenuar a hipersensibilidade mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freud (CFA) em camundongos (PETRUS et al., 2007). Nesse sentido, demonstrou-se que camundongos nocaute para TRPA1 desenvolveram normalmente a hipersensibilidade mecânica induzida por CFA e o antagonista seletivo AP-18 foi considerado ineficaz nestes animais nocautes, sugerindo que o efeito do AP-18 atua sobre o TRPA1. Portanto, o TRPA1 mostrou um papel na sensibilização da nocicepção, e que mecanismos compensatórios nos camundongos nocautes para TRPA-1 podem sobrepujar essa ação (PETRUS et al., 2007). Adicionalmente, esse antagonista AP-18 para o TRPA1 também demonstrou reduzir a nocicepção induzida por um outro estímulo algogênico *in vivo*, cinamaldeído (PETRUS et al., 2007).

O envolvimento do TRPA1 na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA foi confirmado em camundongos com outro antagonista seletivo do TRPA1, mas estruturalmente diferente do AP-18, o composto HC-030031 (EID et al. 2008). Em outro estudo utilizando-se o modelo da formalina para a ativação do TRPA1, o antagonista seletivo desse receptor, o composto HC-030031 foi capaz de bloquear a resposta nociceptiva somática em camundongos (McNAMARA et al., 2007).

O antagonismo sobre o TRPA1 utilizando o composto A-967079 bloqueou a transmissão da estimulação mecânica de alta intensidade à medula espinhal tanto em ratos com lesão articular como naqueles sem dano, indicando que o TRPA1 tem um papel importante em estímulos patológicos e não patológicos funcionando como mecanosensor em ambas as condições (McGARAUGHTY et al., 2010).

Utilizando-se células que expressam o TRPA1 para pesquisar o efeito de um grupo de compostos tricloro benzamidas etílicos (sulfanil) (AMG-2504, AMG-5445, AMG-7160 e AMG-9090), que atuam como antagonistas potentes do TRPA1, frente a estímulos como o alil-iso-tiocianato (AITC) e o frio nocivo (KLIONSKY et al., 2007). O TRPA1 tanto de humanos como de ratos mostraram semelhanças de perfis de ativação ao AITC e ao frio, mas compostos (sulfanil) exibem ação espécie-específica em termos de ação farmacológica sobre o TRPA1, seja antagonista, ou agonista parcial (KLIONSKY et al., 2007).

Componente	Estrutura	Potência (hTRPA1)	Referência	Atividade em Rato
AP-18		3.1 μ M em ensaio de influxo de cálcio, agonista - cinamaldeído	Petrus <i>et al.</i> , <i>Mol Pain</i> , 2007	Antagonista de similar potência
HC-030031		1 μ M em células com patch clamp, agonista – Alil-Isotiocianato (AITC)	McNamara <i>et al.</i> , <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , 2007	Antagonista de similar potência
A-967079		51 nM em células com patch clamp, agonista - AITC	Reilly <i>et al.</i> , <i>CHI Presentation</i> , WO2009/089 082, 2009	Antagonista de similar potência
AMG-9090		21 nM em ensaio com Ca45, agonista - AITC	Klionsky <i>et al.</i> , <i>Mol Pain</i> , 2007	Agonista em ratos
CHEM-5861528		14.3 μ M em ensaio com influxo de cálcio, agonista - AITC	Wei <i>et al.</i> , <i>Anaesthesiol</i> , 2009	Antagonista de similar potência

Quadro 1. Antagonistas do Receptor TRPA1. Fonte: Fanger et al., 2010.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito antinociceptivo do HC-030031, um antagonista seletivo do receptor de potencial transitório anquirina subtipo 1 (TRPA1), em modelos de nocicepção visceral.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do HC-030031 sobre a resposta inflamatória e nocicepção visceral no modelo de cistite hemorrágica induzido por ifosfamida;
- Avaliar o efeito do HC-030031 em outros modelos de nocicepção (nocicepção induzida por óleo de mostarda e contorções abdominais induzidas por ácido acético, zymosan ou misoprostol);
- Estudar a participação de células residentes, óxido nítrico e sistema opióide no efeito antinociceptivo do HC-030031.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos pesando entre 20-25g obtidos no biotério central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais receberam água e ração “*ad libitum*” e foram mantidos em ciclos de claro e escuro de 12/12 horas com temperatura ambiente média controlada a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram colocados em jejum sólidos 16 horas antes da realização dos experimentos.

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA/UFC) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará tendo **protocolo N° 92/10**.

3.2 Drogas e Reagentes

Albumina 3%; Diazepam (Sanofi); Carboximetilcelulose (Plury-Química); HC-030031(Tocris Bioscience); Heparina sódica (Roche); Indometacina (Sigma-Aldrich); Ifosfamida (Genérica–Eurofarma); L-arginina (Sigma-Aldrich); Mesna (Genérica–Eurofarma); Misoprostol (Herbron); Morfina (Cristália); Naloxona (Cristália); N ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester (Sigma-Aldrich); Óleo de Mostarda (Sigma-Aldrich); Tribromo.

3.3 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, nominados a seguir:

- a) Agulhas fenestradas de aço inox 20x12mm;
- b) Agulhas 13x4,5mm e 25x0,7mm;
- c) Aparelho de ultracentrifugação;
- d) Autoclave (FABE);
- e) Balança Analítica modelo 2004 (Beckman);
- f) Becker de 50cc e 250cc;
- g) Cadinho de Porcelana;
- h) Câmara de Neubauer 0,100/0,0025mm²;
- i) Cassetes;
- j) Centrifuga Beckman (modelo J2-21-Beckman);
- k) Estufa;
- l) Lâminas e lamínulas para microscopia;
- m) Material cirúrgico (tesouras, pinças anatômicas e dente de rato);
- n) Microondas;
- o) Microscópio Óptico (Zeiss-Axiovert 10 Zeiss West Germany);
- p) Micropipetas automáticas;
- q) Seringas de 1cc, 5cc, 10cc, 20cc e 60cc (BD);
- r) Tubos Falcon de 20cc e 50cc de plástico (Corning);
- s) Pistilo de porcelana;
- t) Ponteira para pipetas automáticas;

3.4 Soluções e Corantes

3.4.1 Soluções

- a) Ifosfamida 2,0 g (Genérica-Eurofarma) diluído em solução salina 0,9% estéril.
- b) Mesna 400 mg (Genérica-Eurofarma) diluído em solução salina 0,9% estéril.
- c) Zymosan (*Saccharomyces cerevisiae* - Sigma Chemical) diluído em solução salina 0,9% estéril.

d) **Salina Tamponada com Fosfato (PBS)**

Cloreto de sódio P.A. (Merck) 8,00g

Cloreto de potássio P.A. (Merck) 0,20g

Fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) 1,15g

Fosfato de sódio monobásico P.A.(Merck) 0,20g

Água destilada q.s.p 1,00l

O pH foi elavado para 7,4 com NaOH 0,1M e a solução autoclavada antes do uso.

e) **Solução de Ácido Acético (AA)**

Ácido acético Glacial (Merck), utilizado a 0,6% (v/v; 60 mg/Kg; concentração de 629 mg/100 mL), dissolvido em água deionizada. A solução era diluída conforme a necessidade para obtermos as concentrações de 0,15 e 0,30%.

f) **Solução Carboximetilcelulose 0,5% (CMC) (Plury-Química).**

A solução de CMC 0,5% foi preparada com água destilada estéril e aquecida em aparelho microondas para melhor dissolução e homogeneização.

3.4.2 Corantes

a) Corante Pancrômico de Rosenfeld

Giemsa-azul-eosina de metileno 97,0 mg

May-Grunwald-eosina-azul de metileno 53,0 mg

Metanol P.A. (Merck) 1,0 L

b) Corante de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck) 20,0 mL

Azul de metileno 0,5 g

Água destilada 1,0 L

c) Eosina Y a 1%

Eosina Y (Merck) 10,0 g

Água destilada 1,0 L

3.5 Protocolo Experimental

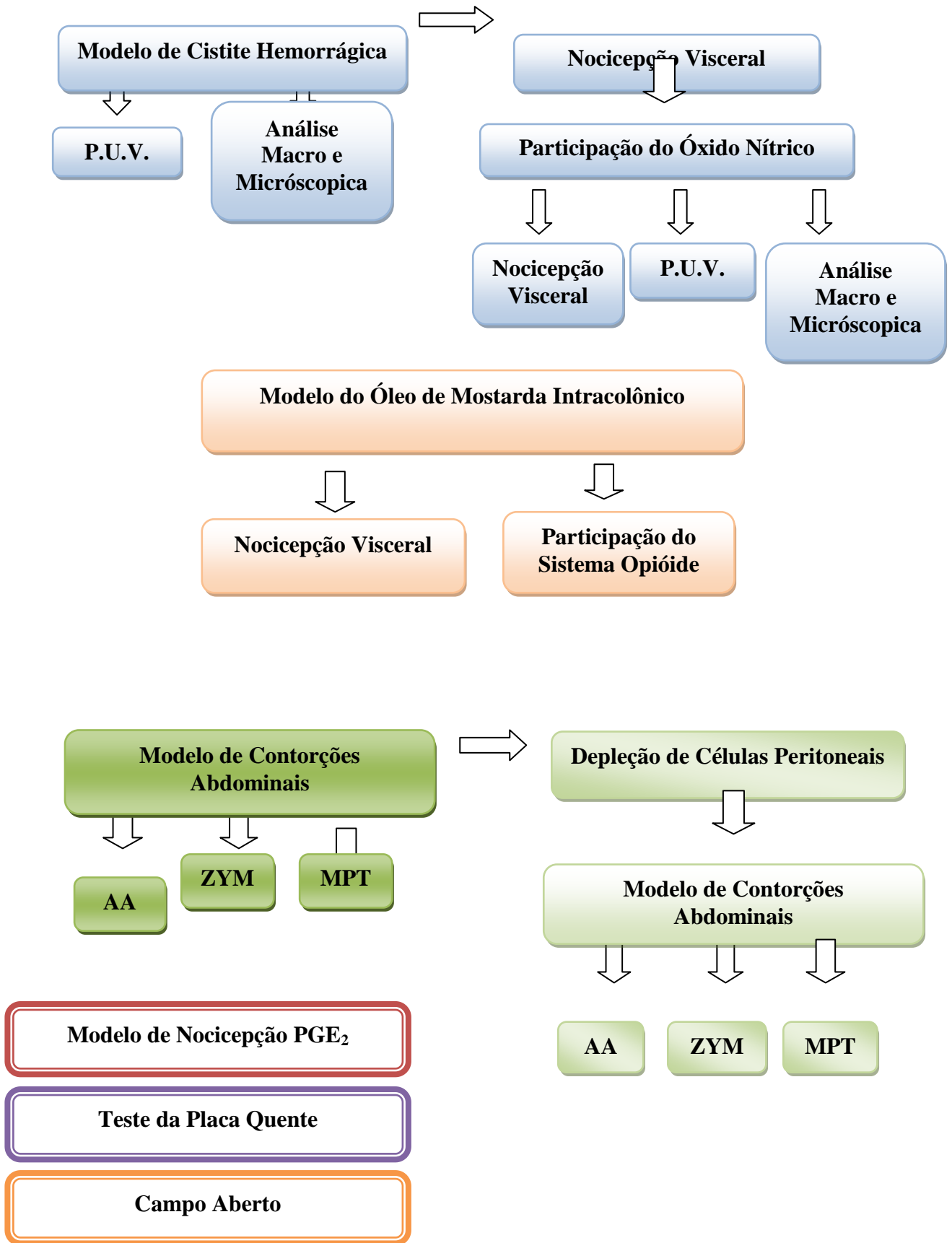


Figura 4. Desenho Esquemático dos Protocolos Desenvolvidos

3.5.1 Indução de Cistite Hemorrágica

Os camundongos após 18 horas de jejum foram tratados com Ifosfamida 400 mg/Kg por via intraperitoneal. Após 12 horas do tratamento com ifosfamida os animais foram submetidos ao teste do Von Frey eletrônico para medir a intensidade da hiperalgesia.

Após a verificação da intensidade da hiperalgesia através do teste de Von Frey eletrônico os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, após uma incisão abdominal mediana, realizou-se cuidadosa dissecação vesical, sendo as bexigas seccionadas junto ao colo e abertas, desprezando-se o conteúdo urinário (**FIGURA 5**). As bexigas foram então pesadas e imersas em formol a 10%. A cistite foi avaliada por alterações no peso úmido vesical, alterações nas análises macroscópicas (**QUADRO 2**) e histopatológicas das bexigas.

3.5.1.1 Avaliação Macroscópica

As bexigas foram cuidadosamente dissecadas e examinadas macroscopicamente, logo após a sua retirada e seu conteúdo esvaziado. Foram atribuídos pelo pesquisador escores “cegos” de edema e hemorragia que variam de 0 a +3 (escores macroscópicos) conforme estabelecido por Gray e colaboradores (GRAY et al.,1986), conforme descrito a seguir (**QUADRO 2**):



Figura 5. Dissecação da Bexiga em Camundongo

	Escores	Edema
Grave	3 +	Edema nas paredes internas e externas da bexiga
Moderado	2 +	Edema restrito as paredes internas da bexiga
Leve	1 +	Edema mínimo
Ausente	0	Sem edema
	Escores	Hemorragia
Grave	3 +	Presença de coágulo intravesical
Moderado	2 +	Hematomas na parede vesical (mucosa)
Leve	1 +	Telangiectasias na parede vesical ou vasodilatação
Ausente	0	Sem Hemorragia (normal)

Quadro 2. Escores de Edema e Hemorragia Estabelecidos por GRAY e Colaboradores (1986)

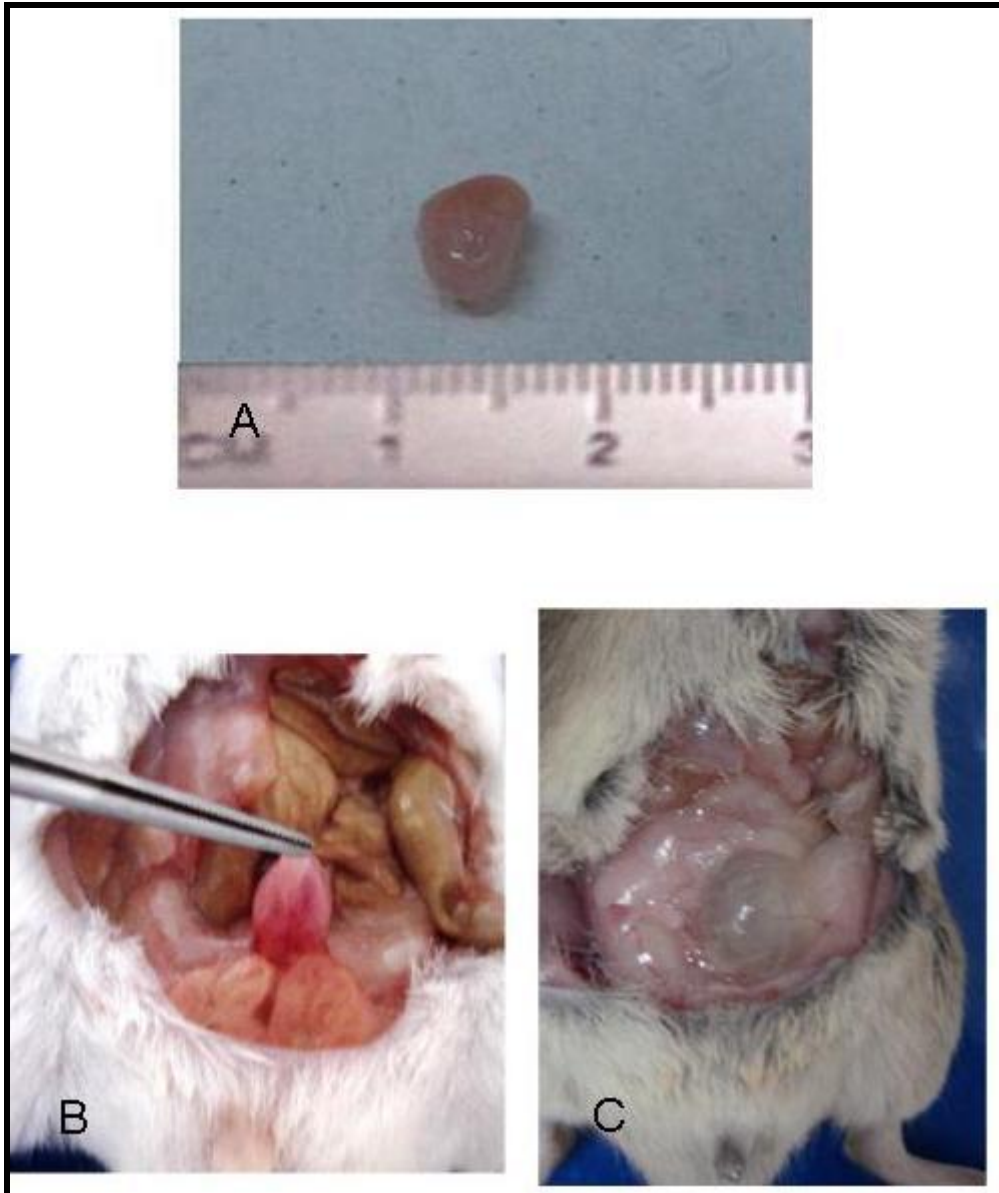


Figura 6. Aspecto Macroscópico das Bexigas. Em (A) observa-se bexiga após dissecação com cistite leve, sendo atribuídos escores macroscópicos 1 para hemorragia e 0 para edema. Em (B) nota-se a maior intensidade da cistite em bexiga ainda em sítio anatômico (escore 2 para hemorragia e 3 para edema). Em (C) pode-se observar o aspecto macroscópico normal (escore 0 para edema e hemorragia) de bexiga repleta de urina em sítio anatômico.

3.5.1.2 Avaliação Microscópica

Após a avaliação macroscópica as bexigas foram fixadas em formol 10%, em seguida desidratadas em álcool 70%, imersas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados em espessuras de 4 µm e corados pela técnica de hematoxilina-Eosina (HE) para análise histomorfométrica por microscopia óptica. As alterações microscópicas foram determinadas por um pesquisador “cego” conforme critérios de Gray e colaboradores (1986), que se seguem:

(0) - Histologia Normal: caracterizada pelo urotélio normal, bem como ausência de úlcera e infiltrado inflamatório.

(1+) - Alterações Discretas: caracterizada por número de células epiteliais diminuídas pela descamação, “apagamento” das dobras habituais da mucosa em decorrência do edema submucoso, hemorragia discreta e poucas úlceras.

(2+) - Alterações moderada: caracterizada por ulceração da mucosa, edema intenso, infiltrado inflamatório importante, depósito de fibrina e hemorragia.

3.5.1.3 Determinação do Peso Úmido Vesical (P.U.V.)

Depois de dissecadas e esvaziadas as bexigas foram cuidadosamente pesadas em balança analítica de precisão, sendo o peso úmido vesical expresso em mg/25g de peso animal. O edema vesical foi quantificado por aumento do peso úmido vesical, reportado como médio ± E.P.M./25g de peso animal.

3.5.2 Tratamento com HC-030031 e Mesna (2-Mercaptoetano-Sulfonato de Sódio)

Os camundongos foram tratados com carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (10 mL/Kg, v.o.) ou composto HC-030031 (75 mg/Kg, 150mg/Kg ou 300 mg/Kg, v.o.) 1 hora antes da administração de salina (10 mL/Kg, i.p.) ou Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.).

O tratamento com mesna (80 mg/Kg, i.p.), protocolo clássico (uma dose 5 minutos antes e duas doses 4 h e 8 horas) após administração da Ifosfamida foi adotada como controle positivo.

3.5.3 Teste de Nociceção Visceral por Von Frey Eletrônico

O Von Frey eletrônico é um analgesímetro digital composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável 0,5 mm² que estimula diretamente o abdômem do animal (**FIGURA 7**). O experimentador foi treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central do abdômem do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma flexão do abdômem ou contorção abdominal após a retirada do abdômem em contato com o aparelho. O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica foi registrada. O experimentador inicialmente fez uma triagem e ambientação dos animais que responderam de modo adequado, um dia antes do experimento. Cuidado foi tomado para não estimular o mesmo ponto duas vezes sucessivamente para evitar aprendizagem ou sensibilização dos animais.

Foram realizadas de três a cinco aplicações distintas para cada animal, antes e após a administração dos estímulos nociceptivos, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (Δ de reação em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero subtraído do valor mensurado nas horas após a injeção do estímulo nociceptivo.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 20 x 17 cm, com assoalho formado por uma rede e malhas medindo cerca de 5 mm²

constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas foram mantidas a uma distância de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo a permitir a estimulação mecânica do abdômem dos animais. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por 30 minutos a adaptação. O teste foi descrito anteriormente por LAIRD et al., 2001.



Figura 7. Teste de Von Frey Eletrônico. Em (A) observa-se os animais em caixas de acrílico e analgesímetro. Em (B) medida da intensidade da hiperalgesia nos animais através do teste do Von Frey Eletrônico

3.5.4 Estudo da Participação do Óxido Nítrico na Nocicepção Visceral

Os camundongos foram divididos em grupos de 08 animais e pré-tratados com L-NAME (10 ou 40 mg/Kg, s.c.) ou HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.), seguida 20 min depois da injeção de L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.) e 1 hora depois foi administrada a Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) para indução da nocicepção visceral outros dois grupos receberam somente CMC 0,5 % (10 mL/Kg, v.o.) ou Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.).

Foram realizadas de três a cinco aplicações distintas para cada animal, antes dos tratamentos com L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester) ou HC-030031 e após a administração da ifosfamida sendo posteriormente calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (Δ de reação em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero (T0) subtraído do valor mensurado nas horas após a administração com ifosfamida (T1).

3.5.5 Teste de Nocicepção Visceral Induzida por Óleo de Mostarda

Os camundongos foram divididos em grupos de 08 animais e pré-tratados com CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.) ou HC-030031 (75 mg/Kg; 37,5 mg/Kg; 18,75 mg/Kg, v.o.), 1h após receberam óleo de mostarda intracolônico 0,75% em salina 0,9% (50uL/animal) através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula intracolônico para a injeção do óleo de mostarda. Foi utilizado vaselina na região perianal para evitar estimulação local pela administração. Um grupo recebeu apenas óleo de mostarda por via intracolônico e outro grupo salina.

Foram realizadas de três a cinco aplicações distintas para cada animal, antes dos tratamentos com CMC 0,5% e o HC-030031 e após a administração do estímulo nociceptivo com óleo de mostarda 0,75%, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (Δ de reação em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero (T0) subtraído do valor mensurado nas horas

após a injeção do óleo de mostarda (T1). O teste foi descrito anteriormente por LAIRD et al., 2001.

3.5.6 Estudo do Envolvimento da via Opióide

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com CMC 0,5% (10 mL/kg, v.o.), HC-030031 75 mg/Kg, v.o. 1 h antes ou morfina (5 mg/Kg, s.c.) 40 minutos antes de receberem óleo de mostarda 0,75% em salina 0,9% (50 µL/animal) intracolônico através de um fina cânula de ponta arredondada, 1mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para a injeção do óleo de mostarda. Foi utilizado vaselina solida na região perianal para evitar a estimulação local pela administração.

O papel do sistema opióide foi avaliado pela administração de naloxona (2mg/kg, i.p) 30 minutos antes da morfina (5 mg/Kg, s.c.) ou concomitante com HC-030031 30 min. da administração da morfina (5 mg/Kg, s.c.) e 1 h da administração do HC-030031(75 mg/Kg, v.o.) os animais receberam óleo de mostarda 0,75% em salina 0,9% (50 µL/animal) por via intracolônica.

Foram realizadas de três a cinco aplicações distintas para cada animal, antes dos tratamentos com CMC 0,5% e o HC-030031 e após a administração do estímulo nociceptivo com óleo de mostarda 0,75%, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação da força em gramas (Δ de reação em gramas), que é o valor mensurado do tempo zero (T0) subtraído do valor mensurado nas horas após a injeção do óleo de mostarda (T1).

3.5.7 Teste de Contorção Abdominal Induzido por Ácido Acético, Zymosan ou Misoprostol

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com CMC 0,5% (10mL/Kg, v.o.), HC-030031 (18,75 mg/Kg, 37,5 mg/kg, 75 mg/Kg. v.o.) 1 hora antes ou

morfina (10 mg/Kg, s.c.) 30 minutos antes de receberem uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% (10mL/Kg), Zymosan (1mg/1mL/animal) ou misoprostol (1ug/250uL/animal) e a intensidade da nocicepção foi quantificada pelo total de contorções abdominais ocorridas nos primeiros 30 minutos após a sua administração. Uma contorção foi identificada como a extensão das patas traseiras acompanhada da contração do abdômem. O modelo utilizado foi descrito anteriormente por KOSTER et al 1959.

3.5.8 Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol

Os camundongos foram anestesiados com tribromo 2,5 % (10 mL/Kg, i.p.) e duas agulhas foram inseridas na região inguinal e outra agulha logo abaixo da região do esterno no animal. Posteriormente 30 mL de salina estéril foi injetada através de uma seringa 60 cc colocada no esterno do animal. A cavidade abdominal foi então massageada levemente por 1 minuto e o exsudato foi coletado através de duas agulhas inseridas na região inguinal do animal e descartado. Mais de 80% dos macrófagos peritoneais foram removidos no exsudato nas lavagens e 90% da salina estéril foi removida (n=6). No grupo Sham os camundongos foram anestesiados com tribromo e três agulhas foram inseridas nos animais como descrito acima e a secção de lavagem com salina não foi executada. O modelo foi descrito anteriormente por SOUZA et al., 1988.

Trinta minutos após a depleção das células peritoneais residentes foi administrados nos animais salina (0,2 mL/animal, n=6), zymosan (1mg/animal, n=6), ácido acético 0,6% (0.2 mL/animal, n=6) ou misoprostol (1ug/animal, n=6) e o número de contorções abdominais foi contabilizados após a administração do estímulo no intervalo de 30 minutos.

3.5.8.1 Contagem Total e Diferencial do Número de Células

Logo após o teste de contorções abdominais os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas cavidades lavadas com 5 mL de PBS + heparina (5UI/mL de

PBS) + albumina 3% (1mL/100 mL de PBS) para obtenção do exsudato peritoneal. Os exsudatos foram recolhidos e colocados em tubos identificados para contagem global e diferencial.

Em outros tubos, também identificados, 180 uL de Turk foi colocado, e a seguir adicionados 20 uL do exsudato. A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer, com fator de correção igual a 25(2,5 da câmara e 10 da diluição). Foi centrifugado 50 uL do exsudato por 5 minutos a 200xg para confecção de lâminas para contagem diferencial das células peritoneais. Após a centrifugação as lâminas foram fixadas e coradas para contagem diferencial.

3.5.9 Teste da Nociceção Induzido por Prostaglândina E2 (PGE₂)

Os camundongos foram separados em 04 grupos da seguinte forma, grupo salina (20µL/pata, i.pl.), grupo PGE₂ (3 nmol/pata, i.pl.), grupo HC-030031(75 mg/Kg, v.o.) e grupo indometacina (5 mg/Kg, v.o.). Os animais foram tratados com HC-030031 ou indometacina 1 hora antes de receberem a administração de 20 µL de uma solução de PGE₂. Após a injeção da PGE₂ nas patas direitas dos animais estes foram observados durante 15 min. e o tempo de lambertura destas patas foram contabilizados com um cronometro e considerado como comportamento nociceptivo. Todos os animais foram aclimatados por um período mínimo de 12 horas no laboratório para experimentos de nociceção. A PGE₂ utilizada foi uma PGE₂ agonista análoga dos receptores prostanóides EP1 e EP3 de camundongos (KIRIYAMA et al., 1997). Esse modelo foi similar ao descrito inicialmente por Ferreira e colaboradores em 2004 (CALIXTO et al., 2007).

3.5.10 Teste da Placa Quente

Os camundongos foram pré-selecionados em uma placa quente com temperatura de 55 ± 0,5 °C com tempo de reação superior a 5 segundos. Posterior a pré-seleção os animais foram tratados com (CMC 0,5%, HC-030031 75 mg/Kg, HC-030031 37,5 mg/Kg, HC-030031, 18,75 mg/Kg; v.o.), (misoprostol 1µg/cavidade, i.p.) e (morfina 5 mg/Kg, s.c.). Após os tratamentos os animais foram colocados na placa quente. O tempo de reação dos animais na placa quente foi determinado antes (basal) e após a administração das drogas nos seguintes tempos: 30, 60, 90 e 120 minutos. O tempo máximo de permanência para cada animal na

placa quente foi de 45 s. O teste foi descrito anteriormente por EDDY; LEIMBACH et al., 1953.

3.5.11 Teste do Campo Aberto

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de uma arena quadrangular com 90 cm² de área total. Tendo sido demarcada sua base em 9 quadrados iguais de 10 cm de lado. Os camundongos foram divididos em três grupos de 08 animais: o grupo I foi tratado com CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.), o grupo II com HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) e o grupo III com diazepam (5 mg/Kg, v.o.). Após 60 min. da administração das drogas para os grupos I, II e 30 min. para o grupo III os animais foram levados individualmente ao campo aberto, ambientados por 1 minuto e, em seguida, observados por 4 min. quanto ao número de campos explorados. O modelo foi descrito anteriormente por CAPAZ et al., 1981.

4.6 Análise Estatística

Os dados paramétricos, expressos como média erro padrão da média (E.P.M.), foram analisados por ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Bonferroni.

Aos dados não paramétricos, expressos como mediana (mínimo-máximo), foram aplicados os teste estatísticos de Kruskal-Wallis e seguido de Dunn.

Teste t-student não pareado para variáveis contínuas e comparação de apenas dois grupos.

Para todas as análises foi considerado significativo um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

4.1.1 Peso Úmido Vesical no Tratamento com HC-030031

A **figura 8** ilustra a determinação do peso úmido vesical relacionado à cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Os dados nos revelam que a ifosfamida (400 mg/kg, i.p.) induz significativo aumento do peso úmido vesical ($44,03 \pm 3,187$; 116%) quando comparado ao grupo tratado apenas com salina ($20,33 \pm 0,7747$) ($p < 0,05$). A figura também mostra que o tratamento com HC-030031 nas doses de 75, 150 ou 300 mg/Kg por v.o. administrado 1 h antes da ifosfamida não modificou o aumento do peso úmido ($55,58 \pm 5,136$; $39,11 \pm 4,665$ e $50,53 \pm 7,740$) quando comparado ao grupo ifosfamida ($p > 0,05$). Contudo, o tratamento com o protocolo clássico, mesna 80 mg/Kg, i.p. (5 min. antes, 4 e 8 h após ifosfamida) preveniu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento do peso úmido vesical ($27,01 \pm 2,586$; 61%) quando comparado ao grupo IFO (**FIGURA 8**).

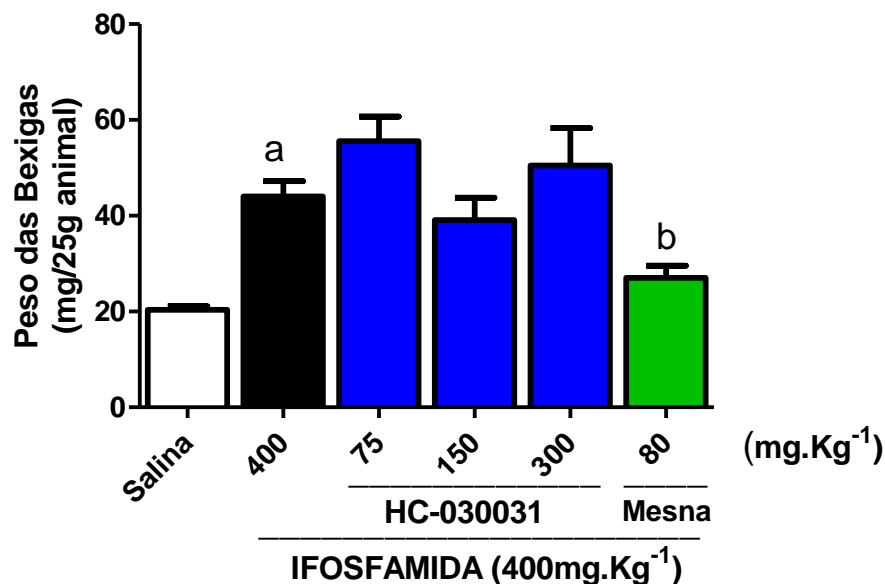


Figura 8. HC-030031 não Possui Efeito Antiinflamatório sobre a Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida. Os animais foram pré-tratados com HC-030031 (75, 150 e 300 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração de salina (10 mL/Kg, i.p.) ou Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.). O tratamento com mesna (80 mg/Kg, i.p.), protocolo clássico (uma dose 5 min. antes e 4 e 8 h após administração da Ifosfamida) foi adotada como controle positivo. A ifosfamida induziu significativo aumento do peso úmido vesical, o que não foi prevenido pela pré-administração do composto HC-030031. Contudo, o mesna significativamente ($p < 0,05$) preveniu o aumento do peso das bexigas. As barras representam as médias \pm E.P.M. dos pesos das bexigas dos camundongos expressos em (mg/25g animal) (N=8). ^a $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo salina e ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo IFO (ANOVA e teste de Bonferroni).

4.1.2 Análise Macroscópica e Microscópica do Efeito do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

A **tabela 1** demonstra a análise macro e microscópica da cistite hemorrágica, observada 12 h após a administração da ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.). Observa-se macroscopicamente a presença de grave edema [2(1-3)] e marcante hemorragia com hematomas de mucosa e coágulos intravesicais [3(1-3)], diferindo significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle [edema: 0(0-0) e hemorragia: 0(0-0)]. O tratamento dos animais com HC-030031 (75; 150 e 300 mg/Kg, v.o.) não preveniu de forma significativa ($p > 0,05$) a intensidade desses eventos inflamatórios e hemorrágicos. Por outro lado, o tratamento com o protocolo clássico com três doses de mesna preveniu significativamente tanto o edema como a hemorragia [0(0-2), 0(0-2), respectivamente] quando comparado ao grupo ifosfamida ($p < 0,05$) como era de se esperar. Adicionalmente, a análise microscópica corroborou os achados macroscópicos, de forma que apenas o tratamento com mesna na dose e esquema clássico conseguiu de forma significativa ($p < 0,05$) proteger as bexigas dos animais tanto para edema como para hemorragia 1[0-2] em comparação ao grupo ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) que apresentou a presença de grave edema e marcante hemorragia 2,5[1-3]. Na **figura 9** estão apresentadas fotos ilustrativas de bexigas de animais tratados com Salina 10 mL/Kg (**A**), Ifosfamida 400 mg/kg (**B**), HC-030031 75 mg/Kg (**C**), HC-030031 150 mg/Kg (**D**), HC-030031 300 mg/Kg (**E**) e mesna 80 mg/Kg (**F**), onde claramente pode-se perceber a não inibição do cistite pelo pré-tratamento com diferentes doses de HC-030031.

Tabela 1 - Análise Macroscópica e Microscópica dos Diferentes Tratamentos do HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Grupos Experimentais	<u>Análise Macroscópica</u>		Análise Microscópica
	Edema	Hemorragia	
Salina (10 mL/Kg)	0 (0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Ifosfamida (400 mg/Kg)	2 (1-3) ^a	3(1-3) ^a	2,5(1-3) ^a
HC-030031(75 mg/Kg)	2 (1-3)	2,5(0-3)	3(2-3)
HC-030031(150 mg/Kg)	1 (0-3)	1,5(0-3)	3(2-3)
HC-030031(300 mg/Kg)	1,5 (1-3)	2(0-3)	3(3-3)
Mesna (80 mg/Kg)	0 (0-2) ^b	0(0-2) ^b	1(0-2) ^b

A tabela 1 expressa os valores da mediana (mínimo e máximo) das alterações macroscópicas e microscópicas induzida pela ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) após 12 h da sua administração e nos grupos tratados com HC-030031 nas doses de (75; 150 e 300 mg/Kg, v.o.) e no grupo tratado com o protocolo clássico com o mesna (80 mg/kg, i.p.) com três doses (5 min antes, 4 e 8 h após a ifosfamida), ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs IFO, (Testes de Kruskal Wallis e Dunn).

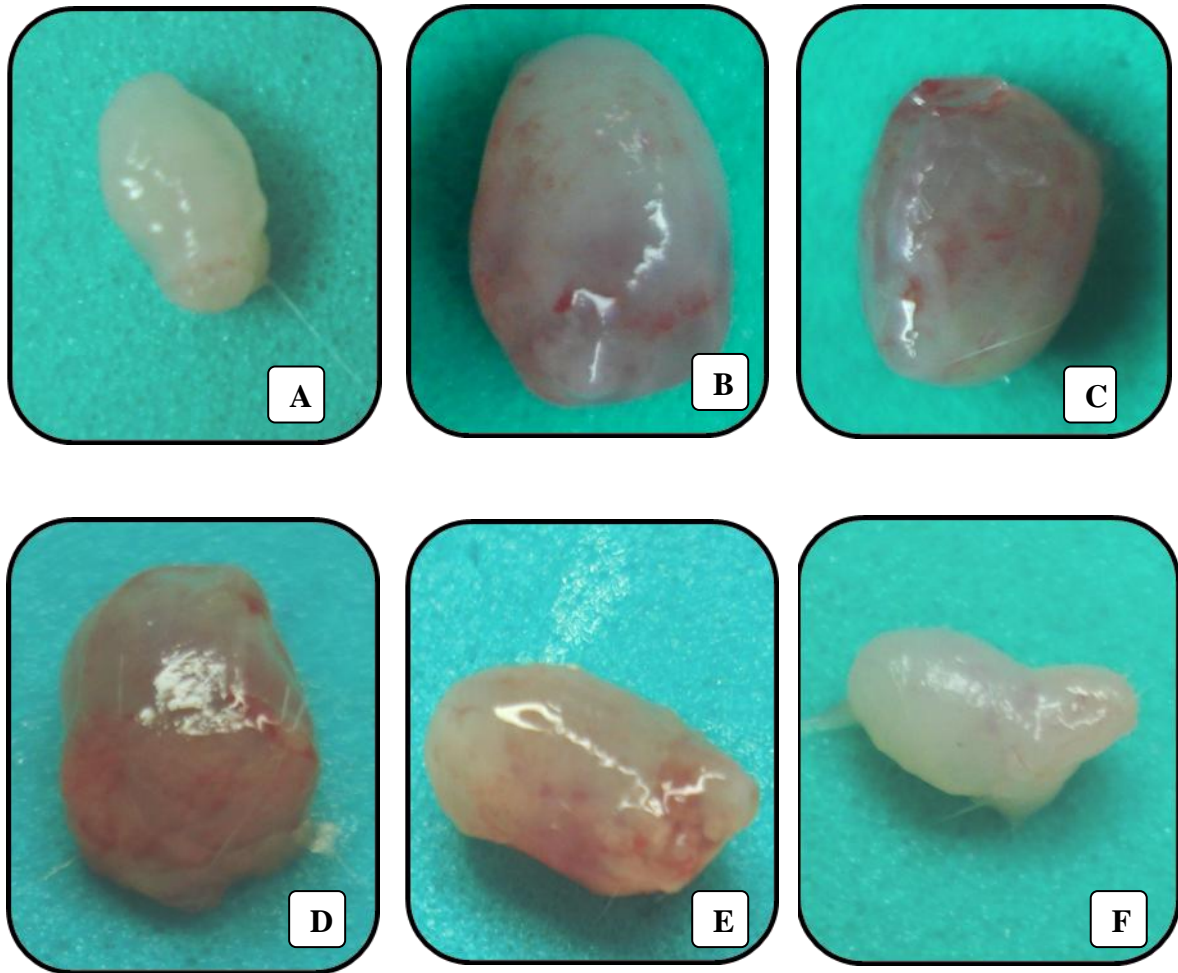


Figura 9. Observação Macroscópica dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida. A ifosfamida (B, 400 mg/Kg, i.p.) induziu alterações macroscópicas na bexiga caracterizada pela marcante presença de edema e hemorragia quando comparado com o grupo controle (A, camundongos tratados somente com salina) que foi medido 12 h após a indução da cistite hemorrágica. Não se observou redução importante com relação ao edema nem proteção quanto a hemorragia nos grupos animais tratados com as diferentes doses de HC-030031 (C, 75 mg/Kg, v.o.), (D, 150 mg/Kg, v.o.) e (E, 300 mg/Kg, v.o.). O tratamento com o mesna (F, 80 mg/Kg, i.p.), protocolo clássico (uma dose 5 min antes, 4 e 8 h após administração da Ifosfamida) foi utilizado e mostrou proteção significativa ($p < 0,05$) quando comparando ao grupo ifosfamida, (N=8).

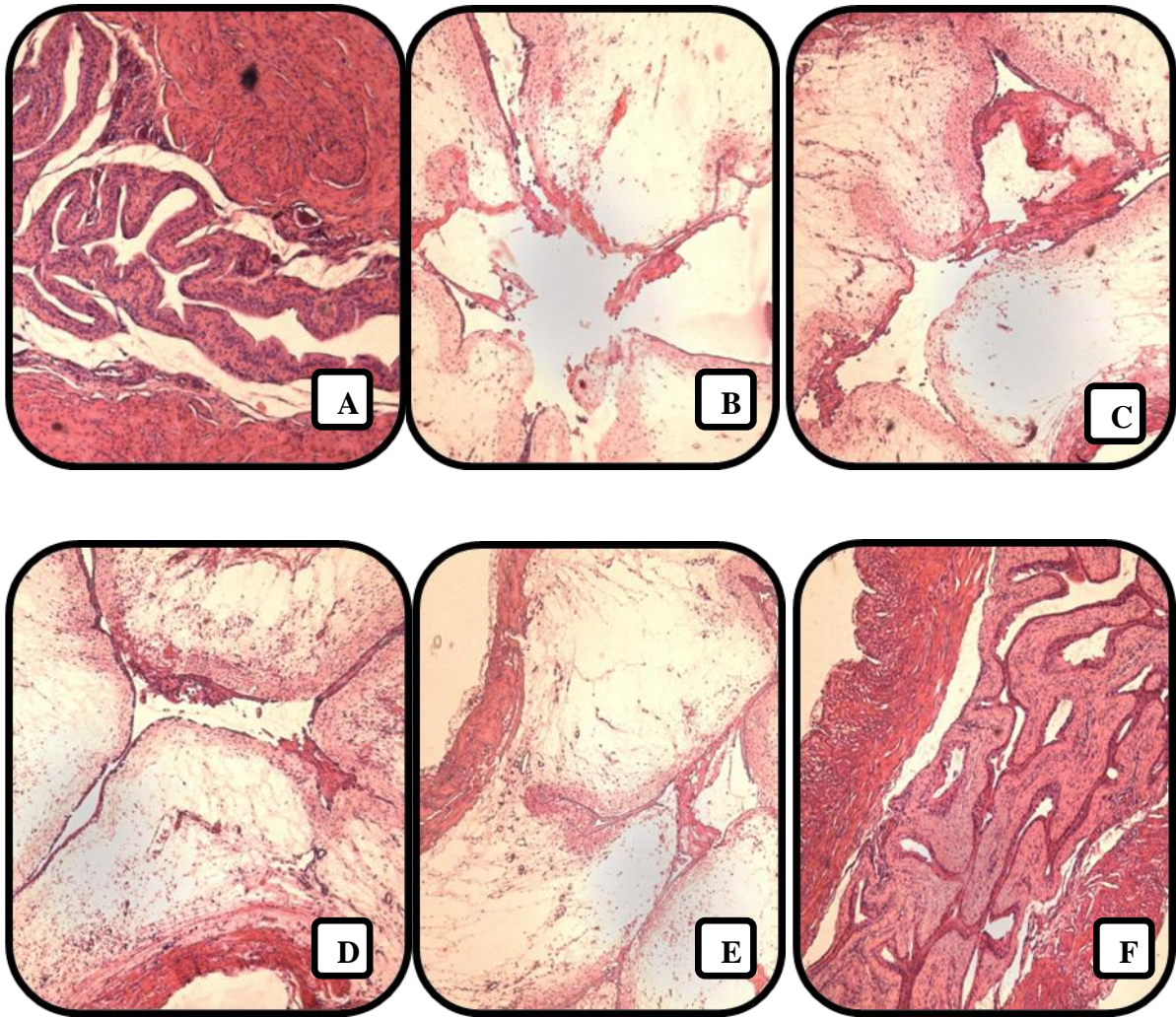


Figura 10. Análise Microscópica dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 e Mesna na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida (Corado por HE, Aumento 40x). A ifosfamida (B, 400 mg/Kg, i.p. induziu intensas alterações microscópicas na bexiga caracterizada por acentuado edema, hemorragia e epitélio desnudo quando comparado com o grupo controle salina (A) caracterizado por epitélio urotelial normal, ausência de edema e hemorragia. Não se observou redução importante do edema nem da hemorragia nos grupos animais tratados com as diferentes doses de HC-030031 (C, 75 mg/Kg, v.o.), (D, 150 mg/Kg, v.o.) e (E, 300 mg/Kg, v.o.). O tratamento com o mesna (F, 80 mg/Kg, i.p.), protocolo clássico (uma dose 5 min. antes, 4 e 8 h após administração da Ifosfamida) foi utilizado e mostrou proteção significativa ($p < 0,05$) quando comparando ao grupo ifosfamida, (N=8).

4.2 Estudo da Nociceção Visceral na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

4.2.1 Efeito dos Diferentes Tratamentos com HC-030031 na Nociceção Visceral

A **figura 11** ilustra o efeito antinociceptivo visceral do antagonista TRPA1. Os dados nos revelam que a ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) induz significativa ($p < 0,01$) nociceção visceral em relação ao grupo salina. A figura mostra também que o pré-tratamento com diferentes doses de HC-030031 (75; 150 e 300 mg/Kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a intensidade da nociceção visceral ($2,750 \pm 1,117$; $3,573 \pm 1,235$ e $3,227 \pm 1,355$, respectivamente) quando comparado ao grupo ifosfamida ($8,130 \pm 1,534$). Adicionalmente observamos que o pré-tratamento com o mesna (3 x 80 mg/Kg, i.p.) também promoveu uma redução significativa ($P < 0,05$) da intensidade da nociceção visceral ($1,387 \pm 0,6505$) quando comparado ao grupo ifosfamida. As diferentes doses de HC-030031 (75, 150 e 300 mg/Kg) e o mesna (80 mg/Kg, i.p.) promoveram proteção de 66%, 56%, 60% e 83%, respectivamente (**FIGURA 11**).

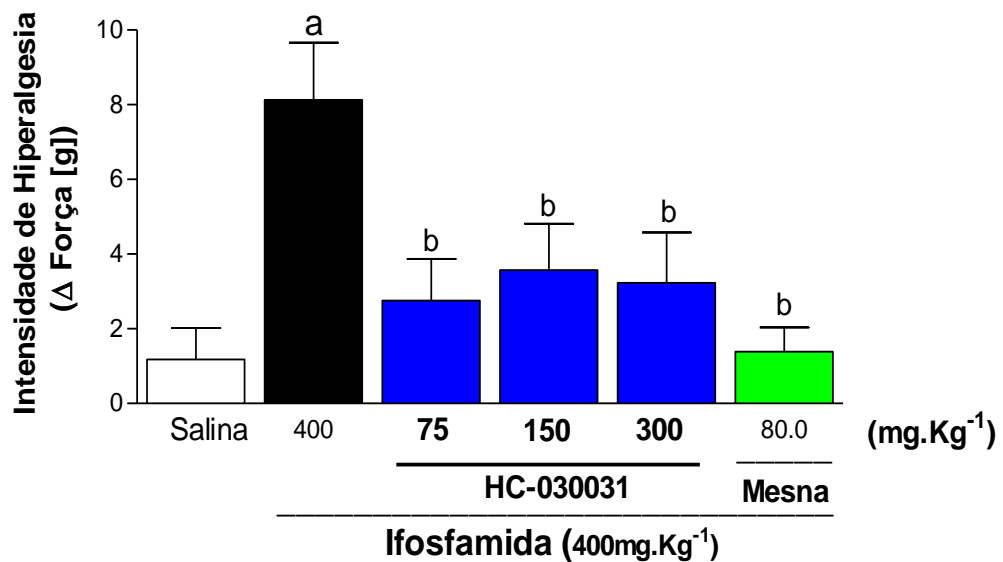


Figura 11. HC-030031 Apresenta Efeito Antinociceptivo Visceral no Modelo de Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida. Os animais foram pré-tratados com HC-030031 (75; 150 e 300g/Kg, v.o.), 1 h antes da administração de salina (10mL/Kg, i.p.) ou Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.). O tratamento com mesna (80 mg/Kg, i.p., 5 min. antes, 4 e 8 h após administração da Ifosfamida) foi adotada como controle positivo. O teste de Von Frey foi executado nos camundongos antes e 11h após o tratamento com ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.). As barras representam as médias \pm E.P.M. da nocicepção dos camundongos expressos em gramas (g) (N=8). ^ap<0,01 representa a diferença estatística em relação ao grupo salina e ^bp<0,05 em relação ao grupo IFO (ANOVA e teste de Bonferroni).

4.3 Estudo da Participação do Óxido Nítrico no Efeito Antinociceptivo Visceral do HC-030031 na Cistite Hemorrágica Induzido por Ifosfamida

4.3.1 Efeito Antinociceptivo Visceral do HC-030031 Independe de Óxido Nítrico

A **figura 12** ilustra a avaliação da participação do óxido nítrico sobre o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 no modelo de nocicepção induzida por ifosfamida. A figura demonstra que a ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) promoveu uma significativa ($p < 0,05$) nocicepção visceral ($6,258 \pm 1,086$) em relação ao grupo salina (10 mL/Kg, i.p.) ($1,970 \pm 0,8969$). Adicionalmente, observamos uma redução significativa ($p < 0,05$) da intensidade da nocicepção visceral obtido pelo HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) ($2,300 \pm 1,078$) e pelo L-NAME na dose de (10 e 40 mg/Kg, s.c.) ($1,588 \pm 0,8607$ e $0,2500 \pm 0,7361$) respectivamente quando comparado com o grupo ifosfamida ($6,258 \pm 1,086$). Os dados nos mostram, também, que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) reverteu significativamente ($p < 0,01$) o efeito antinociceptivo visceral induzido pelo L-NAME (10 mg/Kg, s.c.) ($6,844 \pm 1,235$) não revertendo para L-NAME (40 mg/Kg, s.c.) ($2,300 \pm 0,5654$). Contudo, o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 também não foi revertido ($p > 0,05$) com a administração de L-arginina ($0,7200 \pm 0,6953$).

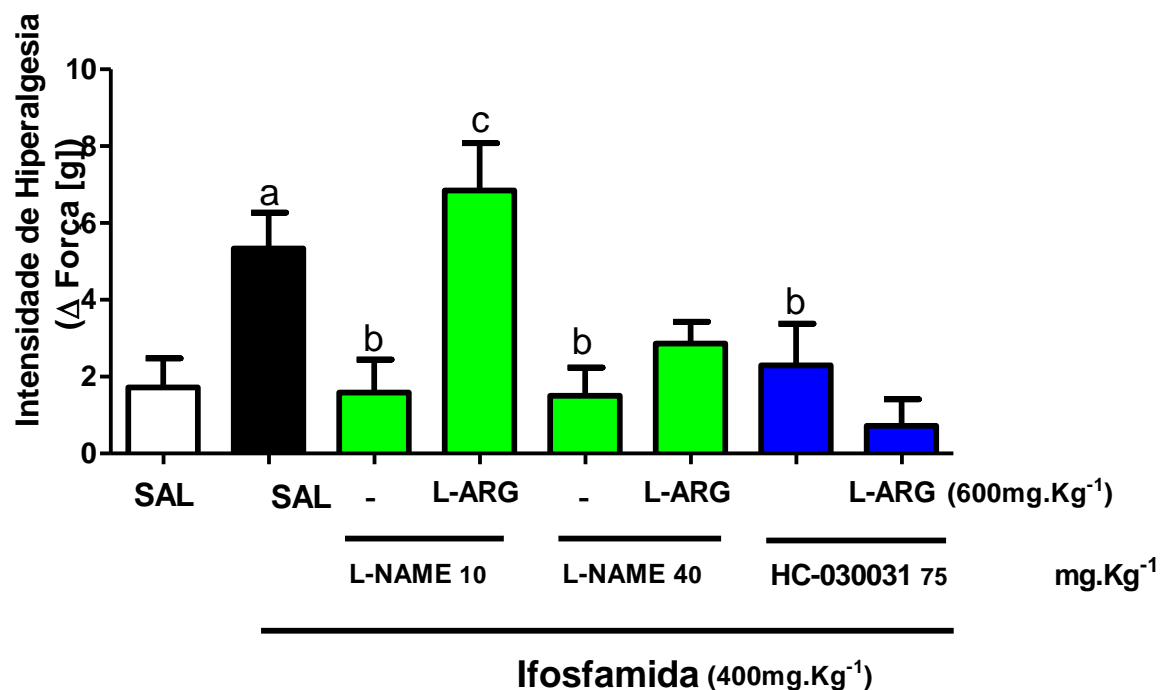


Figura 12. Efeito Antinociceptivo Visceral do Composto HC-030031 Independe de Óxido Nítrico. Os animais foram pré-tratados com L-NAME (10 ou 40mg/Kg, s.c.) ou HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.), seguida 20 min. depois da injeção de L-Arginina (600 mg/Kg, i.p.) e 1 h depois foi administrada a Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) para indução da nocicepção visceral. As barras representam as médias \pm E.P.M. da nociepção visceral dos camundongos expressos em gramas (g), (N=8). ^a $p < 0,05$ vs grupo salina, ^b $p < 0,05$ vs IFO, ^c $p < 0,01$ vs L-NAME 10 mg/Kg (ANOVA e teste de Bonferroni).

4.3.2 Peso Úmido Vesical no Tratamento com HC-030031 e L-NAME

A **figura 13** ilustra a determinação do peso úmido vesical relacionado à cistite hemorrágica induzida por ifosfamida com envolvimento da via L-arginina e óxido nítrico. Os dados nos revelam que o tratamento com a ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) induz significativo ($p < 0,001$) aumento do peso úmido vesical ($57,12 \pm 5,126$) quando comparado ao grupo salina ($19,76 \pm 0,935$). Adicionalmente, o L-NAME (10 e 40 mg/Kg, s.c.) preveniu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento do peso úmido vesical ($39,59 \pm 2,602$ e $25,60 \pm 5,076$, respectivamente) relacionado a cistite hemorrágica induzida por ifosfamida. Observamos, ainda, que a L-arginina (600mg/Kg, i.p.) reverteu significativamente ($p < 0,05$) a proteção conferida pelo L-NAME sobre o peso úmido vesical ($57,28 \pm 5,959$ e $55,77 \pm 6,182$) respectivamente em relação ao grupo L-NAME (10 e 40 mg/Kg, s.c.). A figura apresenta, também, que o tratamento com o HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) e L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) não foram capazes de promover inibição das lesões de forma significativa ($p > 0,05$) contra o aumento do peso úmido vesical ($50,91 \pm 4,790$ e $50,35 \pm 8,315$) respectivamente em relação ao grupo ifosfamida ($57,12 \pm 5,126$) (**FIGURA 13**).

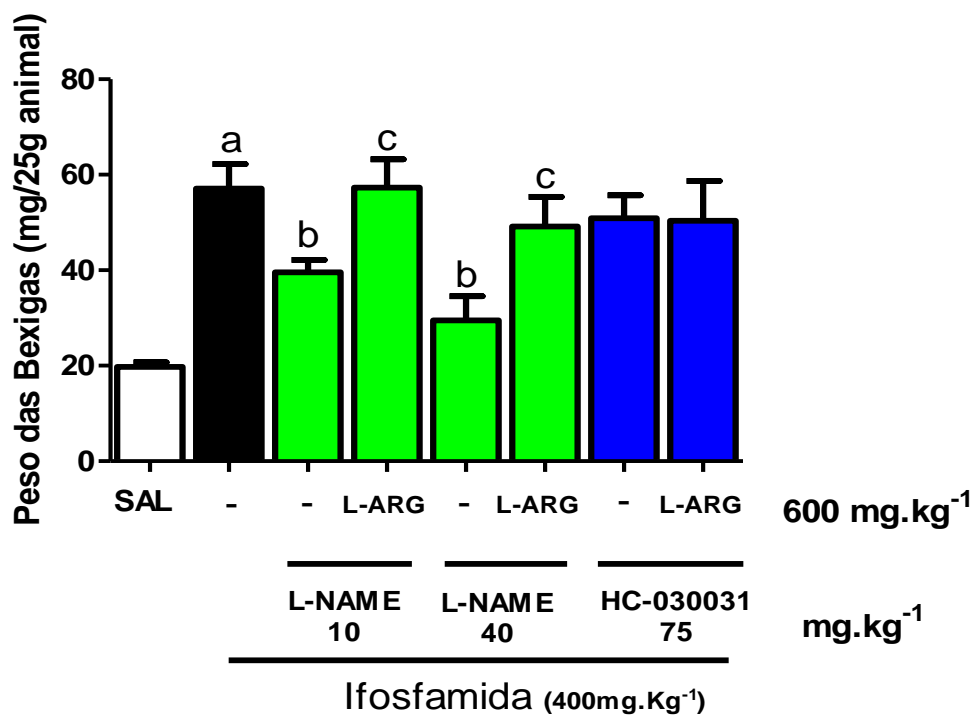


Figura 13. O L-NAME, mas não o HC-030031, tem Efeito Protetor Contra o Processo Inflamatória Associado à Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida. Os animais foram pré-tratados com L-NAME (10 ou 40 mg/Kg, s.c.) ou HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) 20 min. depois receberam L-Arginina (600 mg/Kg, i.p) e 1 h depois foi administrada a Ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) para indução da cistite hemorrágica. As barras representam as médias \pm E.P.M. dos pesos das bexigas dos camundongos expressos em (mg/25g animal) (N=8). ^ap<0,001 representa a diferença estatística em relação ao grupo salina; ^bp<0,05 em relação ao grupo ifosfamida e ^cp<0,05 em relação ao grupo L-NAME 10 mg/Kg (ANOVA e teste de Bonferroni).

4.3.3 Análise Macroscópica e Microscópica com o Tratamento com HC-030031 e L-NAME

A **tabela 2** representa a análise macro e microscópica da cistite hemorrágica observada 12 h após a administração da ifosfamida (400mg/Kg, i.p.). Observa-se macroscopicamente no grupo tratado com ifosfamida a presença de grave edema 2[2-3] e marcante hemorragia com hematomas de mucosa e coágulos intravesicais 3[1-3] diferindo significativamente ($p < 0,05$) do grupo controle [edema: 0(0-0) e hemorragia: 0(0-0)]. Adicionalmente, o tratamento com o L-NAME (10 e 40 mg/Kg, s.c.) conferiu proteção significativa ($p < 0,05$) para edema 1(1-3) e edema e hemorragia [0(0-1) e 1(0-1)] respectivamente quando comparando ao grupo ifosfamida ($p < 0,05$). A tabela mostra, também, que o tratamento com L-arginina (600 mg/Kg, i.p.) foi capaz de reverter de forma significativa ($p < 0,05$) a inibição das lesões para edema 3[1-3] em relação somente ao grupo L-NAME (10 mg/Kg, s.c.). Adicionalmente, observamos que o tratamento dos animais com HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) uma hora antes da administração da ifosfamida (400 mg/Kg, i.p.) não preveniu de forma significativa ($p > 0,05$) a intensidade das lesões tanto para edema como para hemorragia [2(1-2) e (21-3)] respectivamente quando comparados ao grupo ifosfamida [edema 3(1-3) e hemorragia 2(2-3)]. A tabela mostra, também, que a análise microscópica não corroborou os achados macroscópicos completamente mostrando que apenas os dados para edema e hemorragia entre o grupo ifosfamida e o grupo salina foram correspondentes entre as análises macroscópicas e microscópicas.

Tabela 2 - Análise Macroscópica e Microscópica dos Efeitos do HC-030031 e L-NAME na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida

Grupos Experimentais	Análise Macroscópica		Análise Microscópica
	Edema	Hemorragia	
CMC 0,5% (10mL/Kg)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
IFO (400mg/Kg)	3(1-3) ^a	2(2-3) ^a	2(1-2) ^a
IFO + L-NAME (10mg/Kg)	1(1-3) ^b	2(1-3)	2(1-2)
IFO + L-NAME 10 +ARG (600mg/Kg)	3(1-3) ^c	3(1-3)	2(1-2)
IFO + L-NAME (40mg/Kg)	0(0-1) ^b	1(0-1) ^b	1(0-2) ^b
IFO + L-NAME 40 +ARG (600mg/Kg)	2(0-2)	1(1-3)	1,5(0-2)
IFO + ARG+HC-030031(75mg/Kg)	2,5(1-3)	2,5(1-3)	2(1-2)
IFO + HC-030031 (75mg/Kg)	2(1-2)	2(1-3)	2(1-2)

A tabela 2 expressa os valores da mediana (mínimo e máximo) das alterações macroscópicas e microscópicas induzida pela ifosfamida (400mg/Kg, i.p.) após 12 h da sua administração nos grupos tratados com HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) ou L-NAME (10 ou 40 mg/Kg, s.c.) ^ap<0,001 vs CMC 0,5 %; ^bp < 0,05 vs IFO; ^cp < 0,05 vs L-NAME 10 mg/Kg (Testes de Kruskal Wallis e Dunn).

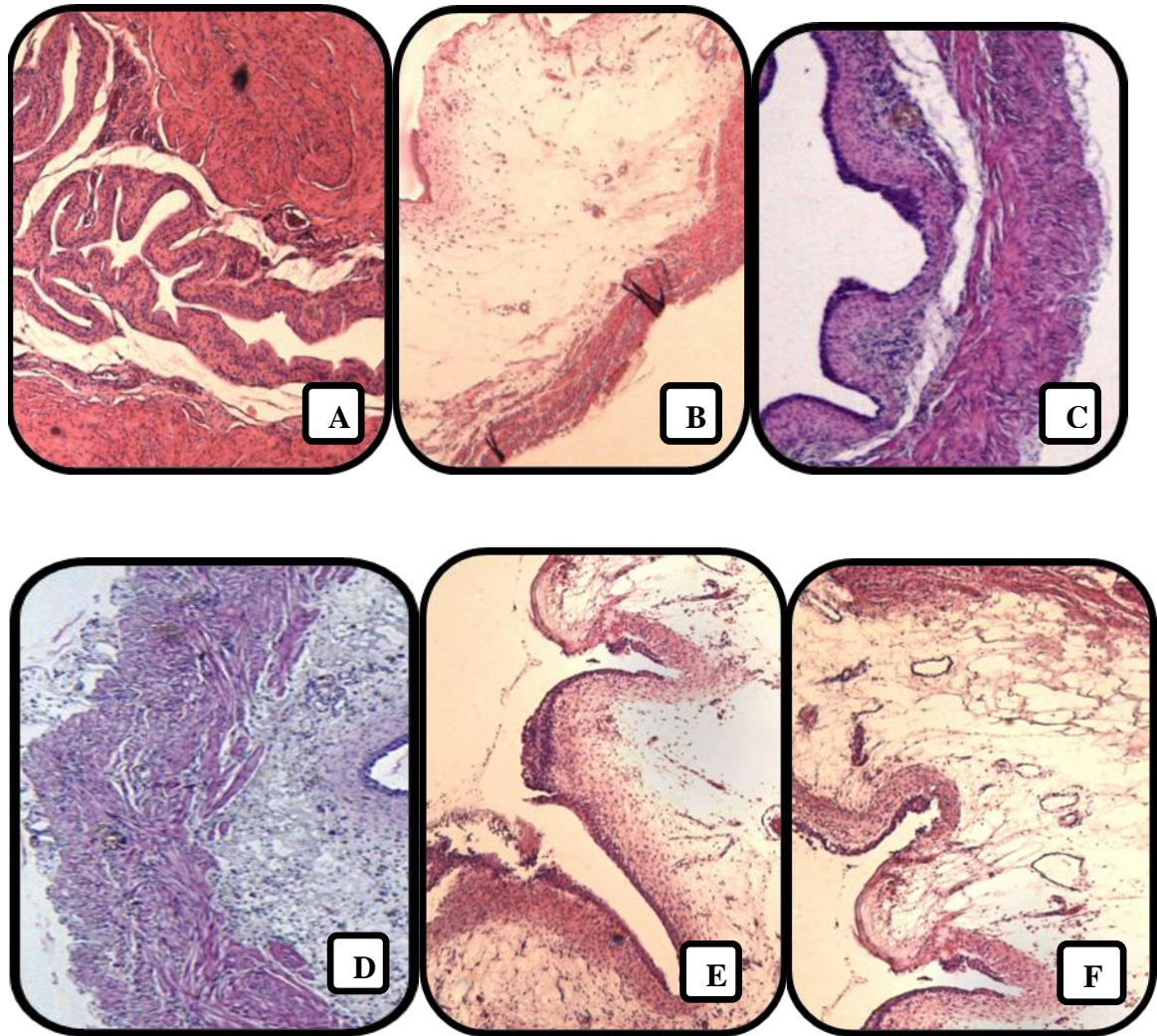


Figura 14. Análise Microscópica do Efeito do HC-030031 e L-NAME na Cistite Hemorrágica Induzida por Ifosfamida (Corado por HE, Aumento 40x). A ifosfamida (B, 400 mg/Kg, i.p. induziu intensas alterações microscópicas na bexiga caracterizada por acentuado edema e hemorragia quando comparado com o grupo controle caracterizado por epitélio urotelial normal (A, animais tratados somente com salina) que foi medido 12 h após a indução da cistite hemorrágica. O tratamento com o L-NAME (C, 40 mg/Kg, s.c.), conferiu proteção para edema e hemorrágia quando comparado ao grupo ifosfamida. A figura mostra, também que o tratamento com L-arginina (D, 600mg/Kg, i.p.) foi capaz de reverter o efeito protetor do edema e hemorragia conferido pelo grupo L-NAME (40mg/Kg, s.c.). Adicionalmente, observamos que o tratamento das bexigas dos animais com HC-030031 (E, 75 mg/Kg, v.o) 1 h antes da ifosfamida não preveniu a intensidade das lesões tanto para edema como para hemorragia, o que não foi alterado pela L-arginina (F), (N=8).

5 Efeito do HC-030031 na Nocicepção Visceral Induzida por Óleo de Mostarda Intracolônico

A **figura 15** ilustra o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 no modelo do óleo de mostarda intracolônico. Os dados nos revelam que o óleo de mostarda 0,75% intracolônico (50 uL/animal) 1h após a sua administração induziu significativa ($p < 0,01$) nocicepção visceral ($6,333 \pm 0,9458$) em relação ao grupo CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.) ($1,250 \pm 0,9204$). Adicionalmente, o HC-030031 nas doses (37,5 e 75 mg/Kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a intensidade da nocicepção visceral ($0,4500 \pm 0,4500$ e $1,536 \pm 0,7653$) respectivamente quando comparado ao grupo óleo de mostarda. Contudo, o HC-030031 na dose de (18,75 mg/Kg, v.o.) não preveniu de forma significativa ($P > 0,05$) a intensidade da nocicepção visceral ($4,617 \pm 0,9738$) quando comparado ao grupo óleo de mostarda (**FIGURA 15**).

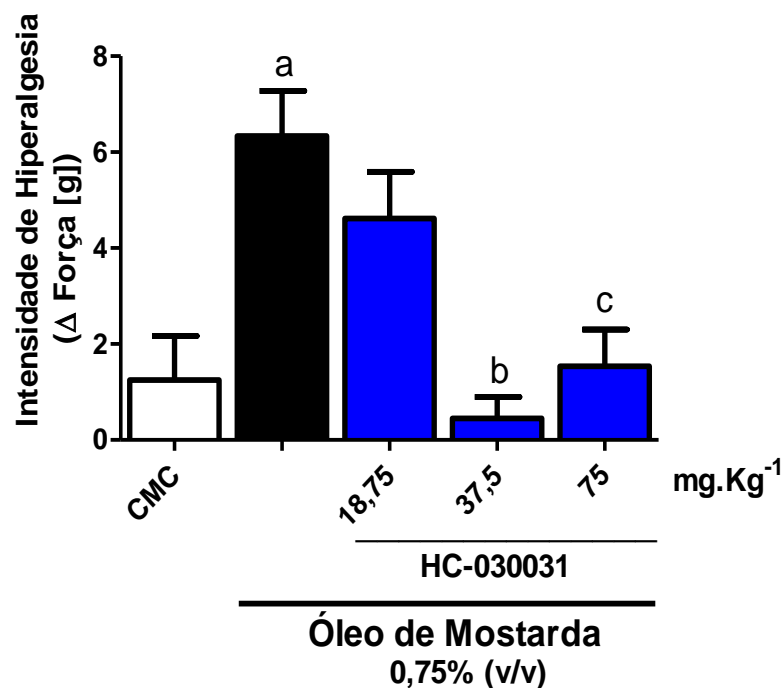


Figura 15. HC-03003 Apresenta Efeito Antinociceptivo no Modelo de Vocepção visceral Induzida por Óleo de Mostarda Intracolônico. Os animais foram pré-tratados com HC-030031 (18,75; 37,5 e 75 mg/Kg, v.o.), 1 h antes da administração de salina (1mL/Kg, i.p.) ou óleo de mostarda intracolônico. O HC-030031 nas doses de 37,5 e 75 mg/Kg, reduziu a nocicepção visceral dos camundongos de forma significativa (^bp < 0,001 e ^cp < 0,05 respectivamente) comparados ao grupo óleo de mostarda (50uL/animal, intracolônico). As barras representam as médias ± E.P.M. da nocicepção visceral dos camundongos expressos em gramas (g) (N=8). ^ap < 0,01 representa a diferença estatística em relação ao grupo salina, ^bp < 0,001 e ^cp < 0,01) em relação ao grupo óleo de mostarda (ANOVA e teste de Bonferroni).

6 Estudo do Efeito do HC-030031 na Nocicepção Visceral Induzido por Óleo de Mostarda e a Participação do Sistema Opióide

A **figura 16** ilustra a avaliação da participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 no modelo de nocicepção induzida por do óleo de mostarda 0,75% intracolônica. Os dados nos mostram que o óleo de mostarda 0,75% intracolônico (50 μ L/animal) induziu nocicepção visceral de forma significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.). Adicionalmente, o HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) e a morfina (5 mg/Kg, s.c.) inibiram de forma significativa ($p < 0,01$) a nocicepção visceral ($1,536 \pm 0,7653$ e $0,07143 \pm 0,07143$, respectivamente) em relação ao grupo óleo de mostarda 0,75% ($5,544 \pm 0,7972$). Contudo, o pré-tratamento com naloxona (2 mg/Kg, i.p.) reverteu de forma significativa ($p < 0,01$) a proteção da nocicepção visceral ($3,125 \pm 1,302$) promovido pela morfina (5 mg/Kg, s.c.), porém o mesmo tratamento não reverteu ($p > 0,05$) o efeito antinociceptivo visceral ($2,240 \pm 1,263$) promovido pelo HC-030031(**FIGURA 16**).

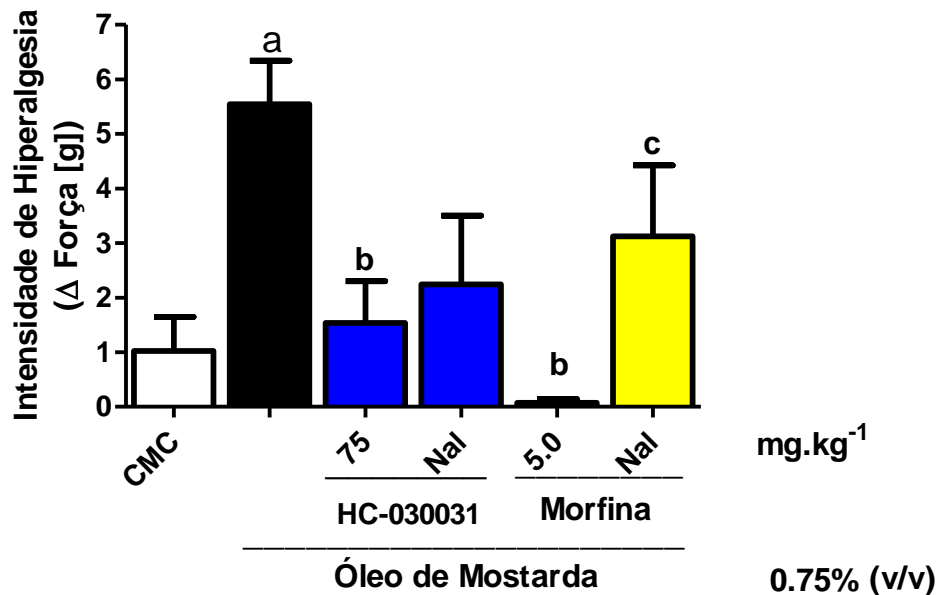


Figura 16. Estudo do Envolvimento do Sistema Opióide no Mecanismo de Ação do HC-030031. CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.) e HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) foram administrados 60 min. antes e a morfina (5 mg/Kg, s.c.) 45 min. antes da administração do óleo de mostarda 0,75% (50 μ L/animal) intracolônico. A naloxona (2 mg/Kg, i.p) foi administrada 30 min. antes da morfina ou no mesmo tempo do HC-030031. Os valores representam a média \pm E.P.M. da nocicepção visceral dos camundongos expressos em gramas (g), (N= 08) por cada grupo. ^ap<0,01 vs CMC 0,5% e ^bp<0,01 vs óleo de mostarda 0,75% intracolônico (ANOVA e teste de Bonferroni).

7 Estudo da Atividade Antinociceptiva Visceral do HC-030031 e a Participação das Células Peritoneais Residentes

7.1 Efeito do HC-030031 no Modelo de Contorções Abdominais Induzida por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol

A **figura 17** ilustra o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 frente ao estímulo nociceptivo do ácido acético 0,6%. Os dados nos mostram que o ácido acético 0,6% (10 mL/Kg, i.p.) induziu nocicepção visceral ($42,43 \pm 3,075$). Adicionalmente, as diferentes doses do HC-030031 (18,75; 37,5 e 75mg/Kg, v.o.) reduziram de forma significativa ($p < 0,01$) o número de contorções abdominais expressos pelos animais durante 30 min. ($25,50 \pm 5,892$; $18,25 \pm 36,92$; $26,38 \pm 2,220$ e $14,92 \pm 2,317$, respectivamente) quando comparados ao grupo ácido acético 0,6%. O grupo controle positivo, indometacina (5 mg/Kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) as contorções abdominais ($2,500 \pm 1,118$) quando comparado ao grupo Ácido acético.

A **figura 18** ilustra o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 frente ao estímulo nociceptivo do Zymosan. Os dados nos mostram que o Zymosan (1mg/cavidade) induziu nocicepção visceral ($8,66 \pm 1,83$). Adicionalmente, as diferentes doses do HC-030031 (37,5 e 75 mg/Kg, v.o.) reduziram de forma significativa ($p < 0,01$) o número de contorções abdominais expressos pelos animais ($1,375 \pm 0,7055$ e $3,714 \pm 1,107$, respectivamente) quando comparados ao grupo Zymosan ($8,66 \pm 1,83$). A figura 8 também ilustra o grupo controle positivo, indometacina (5 mg/Kg, v.o.), reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais ($2,500 \pm 1,118$) quando comparado ao grupo Zymosan.

A **figura 19** ilustra o efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 frente ao estímulo nociceptivo do misoprostol. Os dados nos mostram que o misoprostol (1 μ g/cavidade) induziu nocicepção visceral ($5,57 \pm 1,18$). Adicionalmente, as diferentes doses de HC-030031 (37,5 e 75 mg/Kg, v.o.) reduziram de forma significativa ($p < 0,01$) o número de contorções abdominais expressos pelos animais ($1,000 \pm 0,6901$ e $0,5714 \pm 0,4286$, respectivamente) quando comparados ao grupo misoprostol ($5,571 \pm 1,189$). Contudo, os grupos controles positivos, indometacina (5 mg/Kg, v.o.) e morfina (10 mg/Kg, s.c.) reduziram de forma significativa ($p < 0,001$) as contorções abdominais expressas ($0,5000 \pm 0,3589$ e $0,000 \pm 0,000$, respectivamente) quando comparado ao grupo misoprostol.

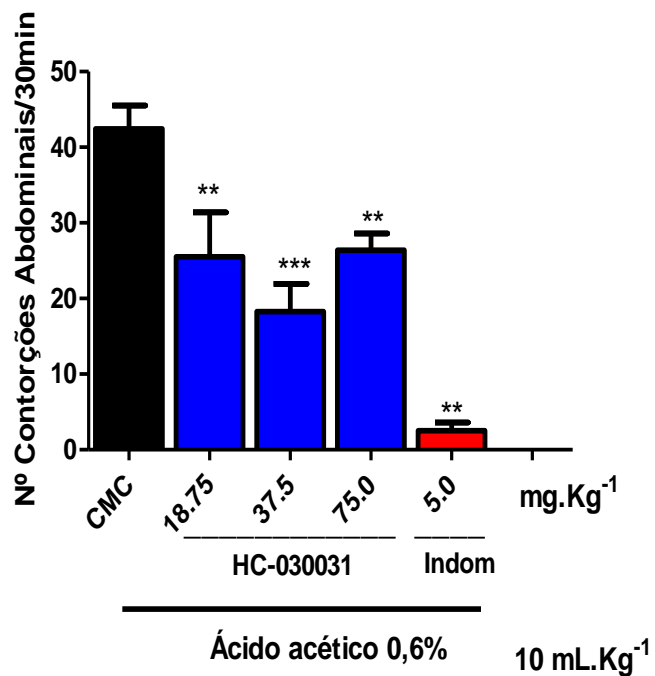


Figura 17. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Ácido Acético (0,6%). Ácido acético 0,6% (10 mL/Kg) foi administrado por via i.p. nos camundongos 60 min. após o tratamento com (CMC 0,5%, 10 mL/Kg, v.o.) ou HC-030031 (18,75; 37,5 e 75 mg/Kg, v.o.) ou Indometacina (5 mg/Kg, v.o.). As barras representam as médias \pm E.P.M. do N^o total de contorções abdominais após a injeção do ácido acético durante 30 min. (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA e teste de Bonferroni).

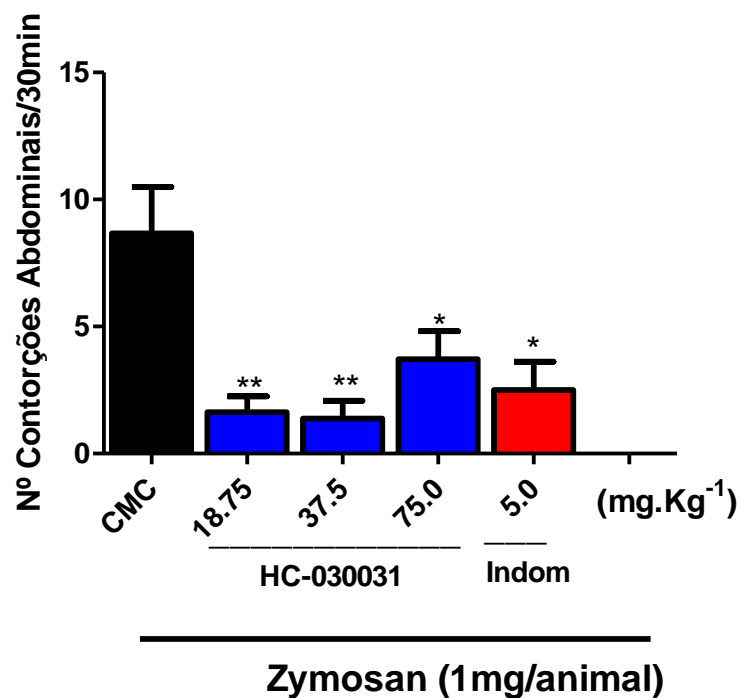


Figura 18. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Zymosan (1mg/animal). Zymosan (1 mg/animal) foi administrado por via i.p. nos camundongos após 60 min. do tratamento com (CMC 0,5%, 10 mL/Kg, v.o.) ou HC-030031 (18,75; 37,5 ou 75 mg/Kg, v.o.) ou indometacina (5 mg/Kg, v.o.). As barras representam as médias \pm E.P.M. do N^o total de contorções abdominais após a injeção do Zymosan durante 30 min. (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA e teste de Bonferroni).

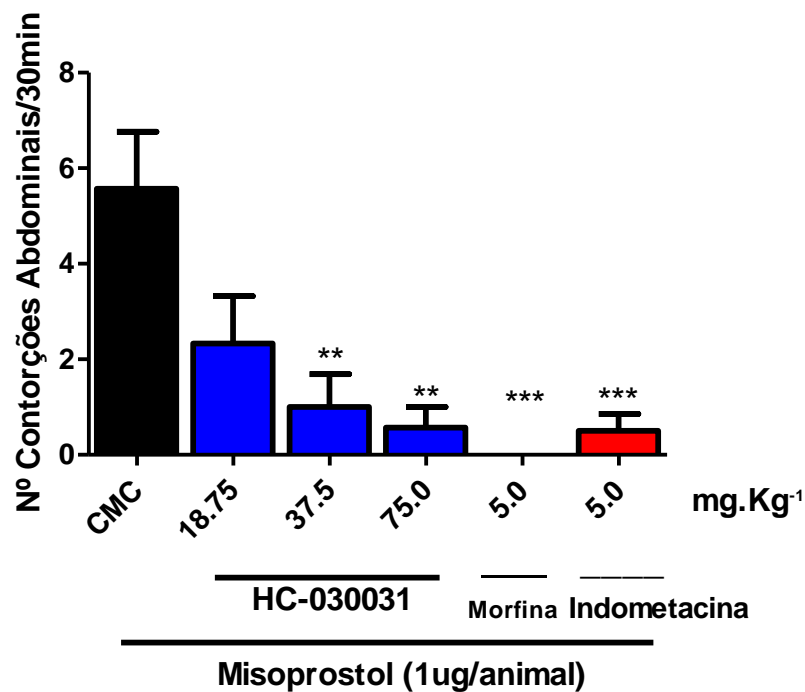


Figura 19. Efeito Antinociceptivo do HC-030031 sobre as Contorções Abdominais Induzido por Misoprostol (1 µg/animal). Misoprostol (1 µg/animal, i.p.) foi administrado por via i.p. nos camundongos após 60 min. do tratamento com (CMC 0,5%, 10mL/Kg, v.o.) ou HC-030031 (18,75; 37,5 ou 75 mg/Kg, v.o.) ou indometacina (5 mg/Kg, v.o.) ou 30 min. após o tratamento com (morfina 5 mg/Kg, s.c.) . As barras representam as médias ± E.P.M. do Nº total de contorções abdominais após a injeção do misoprostol durante 30 min. (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 (ANOVA e teste de Bonferroni).

7.2 Efeito da Depleção das Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol

A **figura 20** ilustra a quantidade de células obtidas após a lavagem da cavidade peritoneal de camundongos. Os dados mostram que no exame do esfregaço da lâmina dos animais lavados verificou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de macrófagos dessas cavidades ($0,4650 \pm 0,1026$) cerca de (84%) quando comparado ao grupo de animais Sham não lavados ($3,044 \pm 0,7546$).

A **figura 21** ilustra o efeito da depleção das células peritoneais residentes sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, Zymosan e misoprostol. Os dados mostram que o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (10 mL/Kg, i.p.) e por Zymosan (1mg/cavidade) nos animais lavados foram reduzidas de forma significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo Sham, cerca de (96% e 80% respectivamente). Contudo, a lavagem peritoneal não interferiu ($p > 0,05$) no comportamento nociceptivo induzido pelo misoprostol (1 μ g/cavidade) quando comparado ao grupo não lavado, Sham.

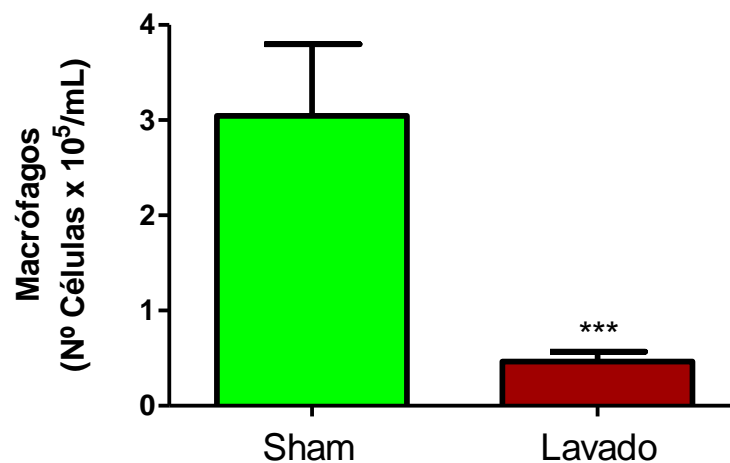


Figura 20. Lavagem da Cavidade Peritoneal Abdominal de Camundongos Reduz a População de Células Residentes. Os camundongos foram anestesiados com tribromo (10mL/Kg, i.p.) e três agulhas foram inseridas na cavidade abdominal, uma na região logo abaixo do esterno para injeção de solução salina (30 mL) e duas outras na região inguinal, para descarte do perfusato. Posteriormente, foram injetados 5 mL de solução PBS heparinizado (5UI/mL de PBS), contendo albumina 3% (1 mL/100mL de PBS). A cavidade abdominal foi então massageada levemente por 1 min. e o exsudato foi coletado por meio de uma pipeta Pasteur para contagem de células, (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo Sham, *** $p < 0,001$ (teste t-student não pareado).

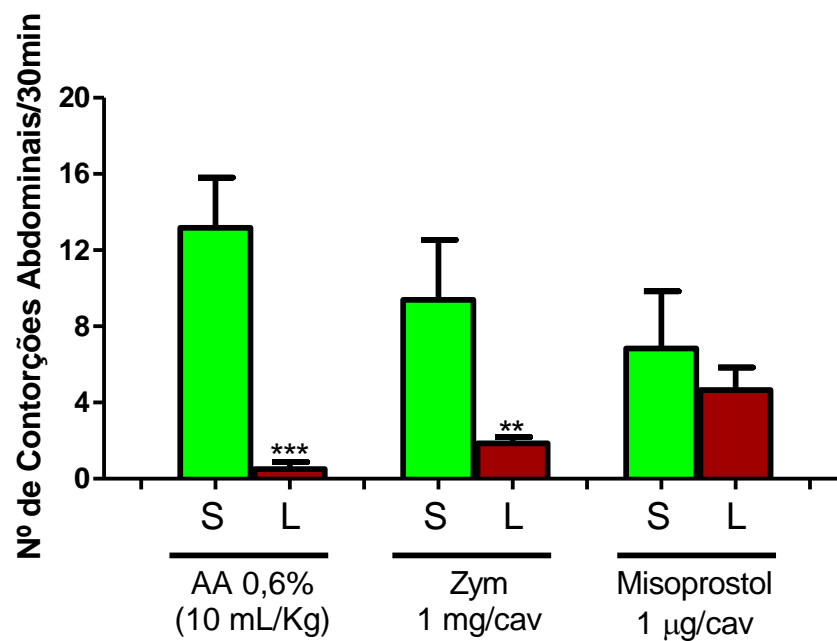


Figura 21. Efeito da Depleção de Células Peritoneais Residentes nas Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético, Zymosan e Misoprostol. O grupo Sham (S) e o grupo lavado (L) receberam ácido acético 0,6% (10 mL/Kg, i.p.), Zymosan (1mg/cavidade, i.p.) ou misoprostol (1µg/cavidade, i.p.) na indução de contorções abdominais. As barras representam as médias ± E.P.M. do Nº total de contorções abdominais após a injeção dos estímulos nociceptivos durante 30 min, (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo Sham, **p<0,01 e ***p<0,001 (teste t-student não pareado).

8 Efeito Antinociceptivo do composto HC-030031 sobre a Nocicepção Induzida por Prostaglandina E2 (PGE₂)

A **figura 22** ilustra o efeito antinociceptivo do HC-030031 através do modelo de nocicepção induzida por PGE₂ na pata direita dos camundongos. Os dados nos mostram que a PGE₂ (3 nmol/pata, i.pl.) induziu nocicepção nas patas dos animais de forma significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo salina (20 μ L/pata, i.pl.). Adicionalmente, o HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) e a indometacina (5 mg/Kg, v.o.) protegeram de forma significativa ($p < 0,01$) a nocicepção na pata dos camundongos em relação ao grupo PGE₂.

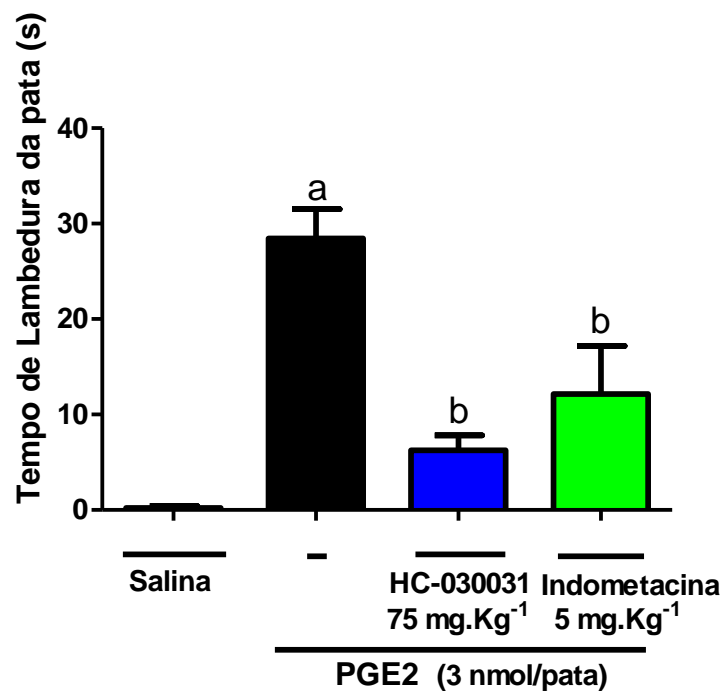


Figura 22. HC-03003 Apresenta Efeito Antinociceptivo no Modelo de Nociceção na Pata Induzida por PGE₂. Os animais foram pré-tratados com HC-030031(75 mg/Kg, v.o.) ou indometacina (5 mg/Kg, v.o.), 1 hora antes da administração de salina (20µL/pata, i.pl.) ou PGE₂ (3 nmol/pata, i.pl.). O HC-030031 na dose de 75 mg/Kg, reduziu a nociceção das patas traseiras direitas dos camundongos de forma significativa ^bp < 0,001 comparados ao grupo PGE₂. As barras representam as médias ± E.P.M. do tempo de lambedura das patas expressos em segundos (s) (N=8). ^ap < 0,001 representa a diferença estatística em relação ao grupo salina e ^bp < 0,01 em relação ao grupo PGE₂ (ANOVA e teste de Bonferroni).

9 Avaliação do Potencial Antinociceptivo do HC-030031 no Teste de Nocicepção Térmica na Placa Quente

A **figura 23** ilustra o potencial antinociceptivo visceral do HC-030031 frente ao teste de nocicepção térmica. Os dados nos mostram que o HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao tempo de latência para exibir comportamentos nociceptivos nos tempos em que foram observados (0, 30, 60, 90 e 120 s) e comparado ao grupo CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.). O tratamento com morfina (5 mg/Kg, s.c.), controle positivo, foi capaz de aumentar de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de latência para o início da nocicepção nos tempos observados (30, 60 e 90 s) em relação ao grupo tratado apenas com CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.) ou HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.).

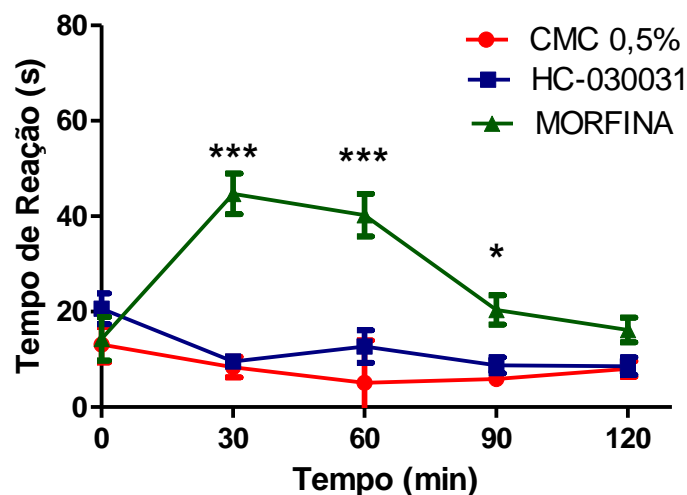


Figura 23. HC-030031 não Possui Efeito Antinociceptivo de Ação Central. CMC 0,5% (10 mL/Kg, v.o.); morfina (5 mg/Kg, s.c.) ou HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) foram administrados após a medição do tempo zero. Os tempos de reação foram medidos em intervalos de 30 min. a partir de 0 min. até os 120 min. O HC-030031 (75 mg/Kg, v.o.) não apresentou diferença significativa comparado ao grupo CMC 0,5%. O controle positivo, morfina apresentou redução significativa no tempo de latência para o início da nocicepção nos tempos (T_{30} , T_{60} e T_{90}) após o tratamento. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do tempo de reação em segundos (N=8). Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu CMC 0,5%. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (Two-Way-ANOVA e teste de Bonferroni).

10 Estudo do Efeito do HC-030031 na Locomoção dos Animais

A **figura 24** ilustra o efeito do HC-030031 sobre a locomoção dos animais em relação ao grupo controle CMC 0,5%. Os dados nos mostram que o HC-030031 na dose de (75 mg/Kg, v.o.) não interferiu na atividade motora espontânea dos animais quando comparado com o grupo controle CMC 0,5% (10mL/Kg, v.o.). Adicionalmente os animais tratados com diazepam (5 mg/Kg, v.o.), adotados como controle positivo, apresentaram uma inibição de forma significativa ($p < 0,01$) da atividade locomotora comparada ao grupo CMC 0,5%.

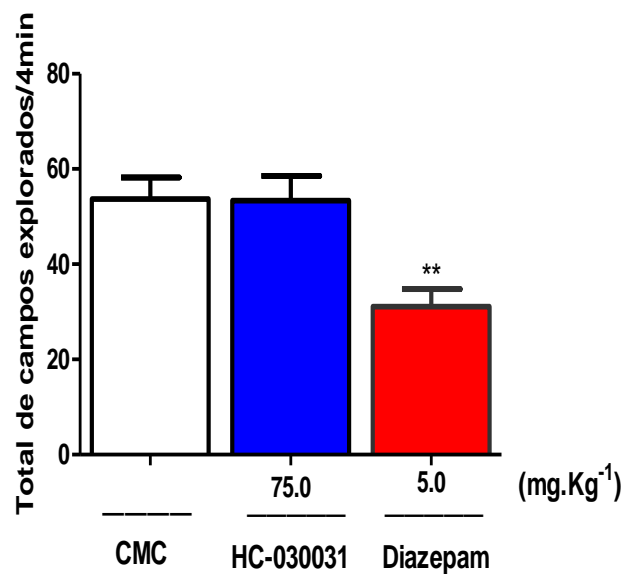


Figura 24. HC-030031 não Interfere na Atividade Locomotora Espontânea dos Camundongos. CMC 0,5% (10 mL/Kg), diazepam (5 mg/Kg) ou HC-030031 (75 mg/Kg) foram administrados por v.o. nos camundongos Swiss 60 min. antes de iniciarem a exploração dos campos na arena por 4 min, (N=8). ** $p < 0,01$ indica a diferença estatística comparado ao grupo salina. As barras representam a média \pm E.P.M. do N^o de campos explorados em 4 min. (ANOVA e teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado um importante efeito inibitório do composto HC-030031, um antagonista do receptor TRPA1 (Receptor de Potencial Transitório Anquirina, subtipo 1), em modelos experimentais de nocicepção visceral. Adicionalmente, foi demonstrado que tal ação antinociceptiva não se acompanhava de uma ação antiinflamatória.

Dados da literatura reportam que o receptor TRPA1 é ativado por vários irritantes que causam dor incluindo o alil-isotiocianato (AITC) (JORDT et al., 2004) e alicina (MACPHERSON et al., 2005; BAUTISTA et al., 2005), respectivamente os ingredientes pungentes do óleo de mostarda e extratos de alho. Além destes, reconhece-se como um ativador de TRPA1 a acroleína (2-propenal), uma substância altamente tóxica, utilizada industrialmente como herbicida. Trata-se do mais reativo dos aldeídos α,β -insaturados, naturalmente encontrada em alimentos, presente no gás lacrimogêneo, escape de veículos, queima do fumo e da vegetação, incluindo produtos de tabaco e poluente do ar que medeiam ações irritantes (BAUTISTA et al., 2006; HALES et al., 1992). Sabe-se que a acroleína é também um metabólito tóxico da ciclofosfamida e ifosfamida (IFO), agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer, artrite severa, esclerose múltipla, e lúpus (COX, 1979; TAKAMOTO et al., 2004; FLEMING, 1997; NICOL, 2002). O acúmulo da acroleína na urina resulta em complicações como cistite hemorrágica (CH), que se caracteriza por hematúria, disúria, incontinência urinária, conseqüentes a um processo inflamatório vesical associado a alterações funcionais (COX, 1979; TAKAMOTO et al., 2004; NICOL, 2002).

Considerando essa base científica e a experiência dos pesquisadores do laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer (LAFICA) em estudos com modelos animais de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e ifosfamida, inicialmente, estudamos o efeito do bloqueio do receptor TRPA1 pelo composto HC-030031 nos eventos inflamatórios da cistite hemorrágica.

No presente estudo, o bloqueio do receptor TRPA1 pelo composto HC-030031 na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida não apresentou proteção para edema, hemorragia e peso úmido vesical em comparação ao grupo controle. Contudo, o pré- tratamento com uroprotetor clássico padrão, 2-mercaptoetano-sulfonato de sódio (mesna), levou a uma significativa proteção.

Em uma revisão realizada por Bautista e colaboradores (2006) destacou-se o papel do TRPA1 como essencial para a ação da acroleína a qual se inicia com a liberação de neuropeptídeos das terminações nervosas sensíveis à capsaicina no pulmão ou parede da bexiga. A liberação de neuropeptídeos por terminais neurais contribui para inflamação neurogênica (WANG et al., 2008). Contudo, tal mecanismo parece não ser determinante, ou fundamental, no contexto da fisiopatologia da cistite hemorrágica. Nesse sentido, nossos dados sugerem que a lesão inflamatória que se desenvolve na bexiga, secundária ao tratamento com ifosfamida, parece não depender da ativação do receptor TRPA1 pelo metabólito acroleína. No entanto, o alvo molecular através do qual a acroleína e outros aldeídos α,β -insaturados deflagram seus efeitos inflamatórios permanecem desconhecidos.

Outro aspecto clínico relacionado à cistite hemorrágica é a dor vesical comumente relatada pelos pacientes.

Alguns estudos relacionam o papel de um receptor da mesma família do TRPA1, o receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1), na nocicepção relacionada à cistite hemorrágica (WANG et al., 2008), em modelos de nocicepção somática (KIM et al., 2010), e de nocicepção visceral colônica (YANG et al., 2008; CATTARUZZA et al., 2009). Outros trabalhos demonstram o papel do TRPA1 sobre a nocicepção de origem somática (EID et al., 2008; MCNAMARA et al., 2007; TAI CHAO et al., 2008) e a importância do antagonista desse receptor, o composto HC-030031, na modulação dos eventos de transdução e transmissão da nocicepção em modelos animais. Assim, considerando-se a importância dos receptores TRP na gênese na nocicepção, é lícito avaliar o papel do TRPA1 na nocicepção associado à cistite hemorrágica.

Em nosso estudo no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, o HC-030031 nas doses de 75; 150 e 300 mg/Kg administrado por via oral protegeu de forma significativa os animais da nocicepção visceral. Adicionalmente, observamos que o pré-tratamento com o mesmo com três doses também promoveu uma redução significativa da intensidade da nocicepção visceral quando comparado ao grupo tratado com ifosfamida.

Eid e colaboradores (2008) observaram que a administração oral do composto HC-030031 nas doses de 150 e 300 mg/Kg, efetivamente inibe a hipersensibilidade

mecânica em modelos animais de dor inflamatória e neuropática e que esse componente parece não ser resultante de um efeito central do HC-030031, como detectado pelo teste da placa quente, e nem a um comprometimento da coordenação motora dos animais. Estes resultados sugerem que o TRPA1 desempenha um papel importante na transmissão nociceptiva e o bloqueio desse receptor poderia ser uma nova abordagem adequada para o desenvolvimento de um potente agente terapêutico seletivo para tratar a dor inflamatória e neuropática (EID et al., 2008). Em outro estudo em que foi utilizado o modelo de nocicepção somática utilizando a formalina, demonstrou-se que a hiperalgesia induzida por essa substância seria resultante da excitação dos neurônios aferentes sensoriais primários mediante ativação direta do receptor TRPA1, sugerindo um papel importante na dor inflamatória (MCNAMARA et al., 2007). Nossos dados sugerem, adicionalmente um papel importante do TRPA1 na nocicepção de origem visceral.

Tai Chao e colaboradores (2008) verificaram que o influxo de cálcio induzido pela formalina é totalmente abolido em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal deficientes em canais TRPA1, sugerindo ser o TRPA1 o único alvo dessa substância. Curiosamente, o influxo de cálcio e correntes induzidas por várias outras substâncias irritantes, incluindo iodoacetamida, formalina e óleo de mostarda, foram abolidas também em camundongos deficientes para TRPA1 e em células obtidas desses animais (TAI CHAO et al., 2008). Estes dados sugerem fortemente que os canais TRPA1 desempenham um papel relevante na gênese da dor induzida por essas substâncias e em nosso modelo experimental de cistite hemorrágica verificamos que esse receptor também seja importante para a dor relacionada ao acúmulo de acroleína na bexiga. Contudo, ainda faltam informações sobre o mecanismo exato de como esse receptor estaria implicado na nocicepção visceral.

Ribeiro e colaboradores (2002) demonstraram a relevante participação de TNF- α e IL-1 β em mediar a produção de NO envolvido na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida e por isso hipotetizamos se o NO estaria contribuindo para o desenvolvimento da nocicepção visceral associada à cistite hemorrágica. Em adição, decidiu-se por experimentar se o bloqueio do TRPA1 como um antagonista seletivo seria acompanhado de uma modulação da via do NO, um importante mediador envolvido na nocicepção somática.

O NO é uma molécula de sinalização gasosa gerada a partir da arginina e do oxigênio através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (STAMLER et al., 1992). O NO desempenha um papel essencial em vários processos biológicos, incluindo sinalização vascular, respostas imunes, neurotransmissão e sensibilização a dor e/ou hiperalgesia (LOWENSTEIN et al., 1994; MELLER et al., 1993).

O NO desempenha um papel essencial no desenvolvimento e manutenção da dor em resposta a lesões e processos inflamatórios através de suas ações em ambos os sítios periféricos e centrais (MELLER et al., 1993; ZOCHODNE et al., 2005). A enzima NOS neuronal é expressa periféricamente em gânglios da raiz dorsal (DRG) sensoriais e centralmente em neurônios da medula espinhal e sofrem aumento de expressão durante lesões em tecidos e processos inflamatórios (MAJEWSKI et al., 1995; VIZZARD et al., 1995). A importância da produção do NO na dor inflamatória e neuropática, tem sido bem documentada através de abordagens farmacológicas e genéticas (BOETTGER et al., 2007; GUHRING et al., 2000).

O papel do NO na hiperalgesia é corroborado por estudos de modulação farmacológica da via desse mediador, nos quais algumas substâncias (ferramentas farmacológicas) são capazes de inibir a dor neuropática e inflamatória em roedores (BOETTGER et al., 2007; GUHRING et al., 2000). Adicionalmente, doadores de óxido nítrico podem causar dor aguda moderada em humanos, sugerindo um papel desse mediador na dor aguda (HOLTHUSEN & ARNDT, 1994).

Em nossos estudos, utilizando modelos animais de nocicepção visceral, observamos de forma inédita que o NO participa da nocicepção visceral associada à cistite hemorrágica, visto que a aplicação de um inibidor inespecífico de óxido nítrico sintase, o N ω -Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME), foi eficaz em prevenir a nocicepção visceral induzida por ifosfamida. Adicionalmente, o efeito antinociceptivo do L-NAME foi revertido com a pré-administração de L-arginina, molécula precursora da produção do NO, sugerindo fortemente a participação desse mediador na nocicepção visceral induzida pela ifosfamida. No entanto, verificamos que a L-arginina não reverteu o efeito antinociceptivo do antagonista do receptor TRPA1, o composto HC-030031, sugerindo, também, que a nocicepção provocada pela ativação deste receptor independe do NO neste modelo de nocicepção visceral.

Baseado em estudos anteriores que mostram a participação do TRPA1 como alvo molecular de várias substâncias químicas levando a um estado de hiperalgesia e

aliado aos nossos achados iniciais acerca do envolvimento deste receptor na nocicepção visceral induzida por ifosfamida pelo bloqueio desse fenômeno pelo composto HC-030031, decidimos avaliar a participação desse receptor em outro modelo de nocicepção visceral, utilizando o óleo de mostarda, um reconhecido agonista do receptor TRPA1 (BAUTISTA et al., 2006). Decidimos também experimentar o composto HC-030031 em doses menores que aquelas utilizadas no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, tendo em vista que, naquele modelo, todas as doses utilizadas conferiram significativo efeito antinociceptivo.

Eid e colaboradores (2008) mostraram que o AITC, uma substância ativa do óleo de mostarda, funciona como um agonista do TRPA1 por ser capaz de ativá-lo em modelos experimentais de nocicepção e que o antagonista desse receptor o composto HC-030031 por via oral é capaz de bloqueá-lo de forma significativa, levando a um efeito antinociceptivo somático (EID et al., 2008). Estudos em modelos de nocicepção somática *in vivo* (MCNAMARA et al., 2007), *in vitro* (EID et al., 2008) e *ex vivo* (KERSTEIN et al., 2009) são bastante diversificados na literatura não podendo dizer o mesmo sobre os de nocicepção visceral.

Em 2001, Laird e colaboradores apresentaram um novo modelo de nocicepção visceral e hiperalgesia em camundongos que consiste em observar o comportamento de nocicepção dos animais que se manifestam ao lambar o abdômen, ao alongar-se, ao contrair o abdômen principalmente após um estímulo nociceptivo, por exemplo, ao agente nociceptivo óleo de mostarda. O teste de Von Frey foi utilizado para verificar o comportamento basal dos animais em comparação com o comportamento hiperalgésico após a instilação do óleo de mostarda intracolônico (LAIRD et al., 2001).

Sanoja e colaboradores (2010) demonstraram que esse modelo de nocicepção visceral apresentado por Laird e colaboradores era perfeitamente reprodutível quando adaptado para ratos. Esses pesquisadores fizeram a instilação intracolônica de capsaicina provocando nocicepção visceral observada através de contorções abdominais, retração abdominal, ao lambar, alongar ou pressionar o abdômen contra a tela de arame no local do teste, comportamentos esses estimulados pela ativação do receptor TRPV1 (SANOJA et al., 2010).

Na presente dissertação os dados obtidos a partir de um modelo de nocicepção visceral induzida pelo óleo de mostarda foram consistentes com as observações iniciais

verificadas no modelo de cistite hemorrágica, indicando um importante papel do receptor TRPA1 sobre a nocicepção visceral.

Jordt e colaboradores (2004) correlacionaram à sensibilidade neuronal ao óleo de mostarda à expressão do TRPA1 *in vivo*. Neurônios sensoriais de camundongos deficientes para TRPA1 apresentam grande diminuição das respostas ao óleo de mostarda (AITC), alicina e para a acroleína demonstrando que o receptor TRPA1 é o provável local molecular primário através dos quais essas substâncias ativam as vias para a nocicepção (BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al., 2006).

Nossos dados mostram que o óleo de mostarda induziu nocicepção visceral de forma significativa confirmando resultados de estudos anteriores onde o TRPA1 é ativado por vários agonistas, inclusive o AITC, o principal composto ativo do óleo de mostarda (LAIRD et al., 2001). Hinman e colaboradores (2006) mostraram que o resíduo de cisteína do domínio N-terminal do TRPA1 reage covalentemente com o carbono eletrofílico do óleo de mostarda contribuindo para a ativação desse receptor (HINMAN et al., 2006). Outros estudos mostram também que esse mesmo receptor pode ser bloqueado por um antagonista seletivo, o composto HC-030031, em modelos de nocicepção somática (MCNAMARA et al., 2007; EID et al., 2008; KERSTEIN et al., 2009), o que também verificamos para a nocicepção visceral.

Um estudo mais recente publicado por Everaerts e colaboradores (2011), sugere que o óleo de mostarda também é capaz de ativar receptores TRPV1 em concentrações maiores que aquelas necessárias para ativar os receptores TRPA1 (óleo de mostarda 1 a 10 mM *in vitro*). Tal observação poderia predizer um viés de interpretação quanto aos nossos achados experimentais relativos ao papel dos receptores TRPA1 na nocicepção visceral. Porém, a despeito do papel dual do óleo de mostarda, o antagonista seletivo de TRPA1, o composto HC-030031, foi capaz de inibir de forma significativa os comportamentos nociceptivos dos animais que receberam óleo de mostarda intracolônico, sugerindo que nessas condições experimentais, o TRPA1 tem relevante papel na nocicepção visceral.

Considerando que o composto HC-030031 demonstrou um importante efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda e que alguns trabalhos demonstram que opióides (LAIRD et al., 2001), ou substâncias que ativam essa via (FORSTER et al., 2009) têm efeito protetor analgésico relevante nesse

modelo decidimos, portanto, avaliar a possível participação do sistema opióide sobre essa atividade protetora do HC-030031.

Laird e colaboradores (2001) mostraram que a morfina nas doses de 3 e 10 mg/Kg, protegeram os animais contra o desenvolvimento da nocicepção visceral após a administração do óleo de mostarda a 2,5% intracolônico.

Os agonistas dos receptores opióides podem modificar tanto os aspectos sensitivos da dor quanto o emocional. Agem via ligação a receptores específicos no SNC e terminações periféricas aferentes primárias inibindo a dor moderada e intensa (GRIFFIN & WOOLF, 2009). O mecanismo de ação dessas substâncias, no processo nociceptivo, ocorre pela interação com receptores opióides, levando ao fechamento dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem-dependentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, o que reduz a liberação de neurotransmissores. Além disso, a ativação desses receptores leva a abertura de canais de potássio (K^+), produzindo hiperpolarização da membrana celular dos neurônios pós-sinápticos, reduzindo a liberação de neurotransmissores, por exemplo, a substância P (DICKESON, 1997; GRAEFF; GUIMARÃES 1999).

Em nossa pesquisa, tanto a morfina como o composto HC-030031 apresentaram efeito antinociceptivo no modelo do óleo de mostarda intracolônico. Contudo, o pré-tratamento dos animais com um antagonista dos receptores opióides, a naloxona, conseguiu de forma significativa reverter o efeito antinociceptivo promovido pela morfina, porém o mesmo não foi observado sobre o efeito antinociceptivo visceral conferido pelo HC-030031. Esses resultados nos mostram que a nocicepção visceral promovida pelo bloqueio seletivo do receptor TRPA1 com o composto HC-030031 ocorre de forma independente da ativação do sistema opióide.

Considerando nossos achados sobre a exclusão da participação do óxido nítrico e do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do HC-030031, decidiu-se por avançar no estudo mecanístico através do qual o TRPA1 poderia desencadear o processo nociceptivo. Assim como o NO, outros mediadores estão envolvidos na nocicepção e são liberados por células residentes como macrófagos e mastócitos. Dados anteriores, publicados por Ribeiro e colaboradores (2000), mostraram que células residentes são fundamentais para o desenvolvimento do comportamento de contorções abdominais induzidas por ácido acético e zymosan. Devido a estas observações, investigamos se o

TRPA1 estaria envolvido na ativação de células residentes levando à liberação local de mediadores associados à gênese da nocicepção.

A importância da presença das células residentes, como macrófagos no local da lesão para a sinalização dos eventos da resposta inflamatória já foi descrita. Alguns achados nesse sentido demonstraram que a intensidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal de animais estimulados com carragenina, zymosan e lipopolissacarídeo derivados de *E. coli* (LPS) (estímulos exógenos) ou com TNF- α e IL-1 β (estímulos endógenos) é proporcional ao número de macrófagos residentes presentes nessa cavidade (FACCIOLI et al., 1990; SOUZA et al., 1988). Na dor inflamatória a presença dessas células também parece ser crítica. Pesquisadores do LAFICA demonstraram posteriormente a importância desses macrófagos residentes na nocicepção induzida por estímulos como ácido acético e zymosan no modelo de contorções abdominais um modelo considerado víscero-somático RIBEIRO et al., 2000). Adicionalmente, esses mesmos pesquisadores confirmaram que a depleção das células residentes da cavidade peritoneal, por lavagem prévia, diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e zymosan, mas não do ilosprost (análogo estável da PGI₂) (THOMAZZI, 1996). O aumento da população de macrófagos, através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato, aumenta também o número de contorções abdominais induzidas por esses estímulos (THOMAZZI, 1996; RIBEIRO et al., 2000).

Estudos mostram também que mastócitos residentes da cavidade peritoneal parecem importantes no desenvolvimento da resposta nociceptiva. Pesquisadores do LAFICA mostraram que a depleção de mastócitos peritoneais de camundongos pré-tratados com o composto 48/80 diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e zymosan no modelo de contorções abdominais (RIBEIRO et al., 2000).

Em animais, muitas substâncias algogênicas, como a capsaicina, óleo de mostarda e ciclofosfamida, quando aplicadas a estruturas viscerais induzem a expressão de comportamentos relacionados à dor envolvendo fibras aferentes sensíveis à capsaicina (JORDT et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2003; MAGGI et al. 1992).

Essas substâncias são capazes de induzir dor, bem como uma reação inflamatória, quando fibras aferentes viscerais são sensibilizadas ou neurônios centrais

sofrem uma mudança em sua excitabilidade (sensibilização central) após persistente ativação visceral (GEBHART, 1995).

A injeção intraperitoneal de substâncias algogênicas no modelo de contorções abdominais pode distinguir dois padrões de estimulação. Um considerado víscero-específico, quando substâncias que induzem a forte contração da musculatura das vísceras são utilizadas (como a acetilcolina e salina hipertônica), oferecendo respostas de curta duração (inferior a 5 minutos) e, portanto, de pouca relevância. A utilização de substâncias para induzir inflamação induz um padrão de resposta mais prolongado, caracterizando uma estimulação víscero-somática, devido ao peritônio ser composto também de estrutura parcialmente somática (LAIRD et al., 2001).

Assim, optamos por verificar se o papel do receptor TRPA1, através do bloqueio com o HC-030031, ocorreria de forma dependente de células residentes peritoneais ou não. Utilizamos, para tanto, o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, zymosan e misoprotol (um análogo estável de prostaglandina E₁).

Na presente dissertação, utilizando o modelo de contorções abdominais observamos que o pré-tratamento dos animais com o composto HC-030031 em todas as doses utilizadas preveniu de forma significativa a nocicepção induzida pelo ácido acético, zymosan e misoprostol em comparação ao grupo controle. Utilizamos como controle positivo um droga anti-inflamatória não esteróide (AINE) de reconhecida ação antinociceptiva que age inibindo a síntese de PG um dos mediadores finais no processo de sensibilização nociceptiva.

Inicialmente, reproduzimos as observações feitas Ribeiro e colaboradores (2000) para o ácido acético e zymosan em relação à participação de células residentes nos comportamentos de contorções abdominais. Adicionalmente, de forma inédita, demonstramos que outro análogo de prostaglandinas E₁ (misoprostol) induziu padrão de contorção similar ao verificado para o iloprost (Ribeiro et al 2000). Como prova da ausência de participação de células residentes no efeito nociceptivo do misoprostol, realizou-se a lavagem da cavidade peritoneal. Verificamos que os animais continuavam a expressar os comportamentos nociceptivos após a injeção de misoprostol. Assim, verificamos que o composto HC-030031 foi efetivo em inibir a atividade nociceptiva no modelo víscero-somático de contorções abdominais de todas as três substâncias algogênicas (ácido acético, zymosan e misoprostol). Esse estudo sugere, portanto, um

possível papel desse receptor sobre a estabilização direta de nociceptores, de forma independente da participação de células residentes peritoneais.

Contudo, não se pode descartar o papel de células residentes na modulação da função do receptor TRPA1. Estudos recentes demonstraram que proteases liberadas por mastócitos podem sensibilizar receptores TRPA1 de uma maneira indireta via receptores ativados por proteases (PAR2), contribuindo para a dor inflamatória (DAI et al., 2007; YU et al., 2009).

A indometacina, utilizada como controle positivo, foi efetiva em inibir de forma significativa a nocicepção provocada pelos estímulos ácido acético e zymosan; e surpreendentemente inibiu também as contorções abdominais provocadas pelo misoprostol, um análogo estável de (PGE₁).

Materazzi e colaboradores (2008) demonstraram também que metabólitos de ácidos graxos dependentes de COX causam nocicepção através da ativação do receptor TRPA1. As Prostaglandinas (PG) ciclopentenônicas, incluindo, 15-d-PGJ₂, PGA₂, PGA₁, são metabólitos prostaglandínicos formadas por desidratação no anel ciclopentano de PGD₂, PGE₂ e PGE₁, respectivamente. Essas Prostaglandinas são caracterizadas pela presença de um grupo carbonila α,β -insaturados altamente reativos no seu anel ciclopentenônico. As ações biológicas das PGs ciclopentenônicas não são mediadas por ativação clássica da proteína G acoplada a receptores prostanóides, mas sim através da interação com outras proteínas-alvo.

A injeção intraplantar de 15-d-PGJ₂, PGA₂, PGA₁ e 8-iso-PGA₂ produziu um aumento significativo na expressão c-fos (indicador da expressão neural) em camundongos selvagens para TRPA1, mas não em camundongos nocautes para TRPA1. A injeção intraplantar de PGE₂ aumentou a expressão de c-fos de maneira similar em ambos os camundongos selvagens e nocautes para TRPA1. As PG ciclopentenônicas e isoprostano ativam a via nociceptiva espinhal por um mecanismo que exige o receptor TRPA1, mas a PGE₂ ativa essa via por um mecanismo independente de TRPA1 (MATERAZZI et al., 2008).

Considerando a ausência de informações na literatura acerca da função da PGE₁ (misoprostol) como ativador direto dos nociceptores, procuramos corroborar nossa hipótese de que o TRPA1 estaria modulando a transmissão nociceptiva de uma maneira

direta, pela estabilização do nociceptor, utilizamos a injeção intraplantar de PGE₂, sabidamente um ativador direto de nociceptor (CALIXTO et al., 2007). Desta forma mostramos que o HC-030031 e a indometacina são capazes de proteger de forma significativa da nocicepção provocada pela administração intraplantar de PGE₂ nas patas de camundongos. MARTINEZ-VENTURA e cols. (2004) demonstraram que, adicionalmente ao efeito inibitório da indometacina sobre a síntese de PGE₂, esta também ativaria a via do L-arginina-NO-GMPc neuronal levando a um efeito antinociceptivo periférico (MARTINEZ-VENTURA et al., 2004). Isso explicaria a proteção da indometacina tanto no modelo de PGE intraplantar como no modelo de contorções abdominais.

Recentemente Catarruzza (2010) e outros pesquisadores identificaram agonistas endógenos do TRPA1 capazes de ativá-lo diretamente incluído produtos do estresse oxidativo como o 4-hidroxinonenal (HNE), 4-oxononenal (4-ONE) e metabolitos ciclopentenona de prostaglandinas (PGE) (CATARRUZZA et al., 2010; TAYLOR-CLAK et al., 2008; TREVISANI et al., 2007).

Algumas drogas apresentam um falso efeito antinociceptivo por apresentarem uma atividade depressora no SNC. Por essa razão, experimentamos se o tratamento dos animais com o composto HC-030031 poderia levar a um falso resultado antinociceptivo devido a um comprometimento locomotor destes animais ou por um estado induzido de sedação. Por isso submetemos os animais a um teste que pudesse avaliar esse potencial sedativo e ansiolítico do composto HC-030031 excluindo a possibilidade do efeito antinociceptivo do HC-030031 estar relacionado a distúrbios não específicos da atividade locomotora dos animais, o teste do campo aberto.

Soja e colaboradores (2002) relataram que várias drogas analgésicas com ação depressora sobre o SNC e muscular podem reduzir a coordenação motora em animais bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOJA et al., 2002).

Originalmente descrito por Hall (1934) como uma arena circular para testar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em ratos. (HALL, 1934). O teste do campo aberto é apropriado para medir comportamento de ansiedade, sedação e atividade exploratória em modelos animais (PRUT & BELZUNG, 2003). Neste teste foi observada a ambulação desses animais.

A ambulação em um ambiente novo representa a atividade motora do animal. O número total de passagens através dos diversos quadrantes do aparato avalia a atividade exploratória desse animal, que pode ser afetada por drogas com ação no sistema nervoso central (SNC) ou a relaxantes musculares periféricos. A mobilidade é função do grau de excitabilidade do SNC e uma diminuição desse parâmetro é sugestiva de uma atividade sedativa (OZTURK et al., 1996; FRANCO et al., 2005). Caso a ambulação estivesse aumentada, poderíamos correlacionar o efeito da droga com um efeito ansiolítico.

No presente estudo três grupos de animais foram colocados em uma arena quadrangular demarcadas em vários quadrantes (teste do campo aberto) (LIMA-JÚNIOR, 2005) e em seguida foram observados por cinco minutos sendo o primeiro minuto para ambientação e os outros quatro minutos para a contabilização do número total de campos explorados pelos animais (CAPAZ et al., 1981).

Neste teste o grupo tratado com HC-030031 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Porém o grupo tratado com o fármaco diazepam, um fármaco reconhecidamente ansiolítico, apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que o composto HC-030031 não interfere na locomoção desses animais, nem possui ação ansiolítica. Eid e colaboradores (2008) mostraram em modelos de dor inflamatória e neuropática que o composto HC-030031 não interfere na coordenação motora dos animais no teste do rota rod em ratos. Essa metodologia consiste em observar e registrar o tempo de permanência dos animais sobre uma roda giratória programada a oferecer aos animais rotações por minuto a fim de medir o efeito do relaxamento muscular ou falta de coordenação motora provocado por drogas nestes animais (EID et al., 2008).

Adicionalmente, foi questionado se o HC-030031 teria um efeito antinociceptivo central ou essa atividade estaria restrita ao componente periférico do nocicepção. Para tanto, utilizamos o teste da placa quente, já bastante referenciado na literatura, descrito e validado por Eddy e Leimbach em 1953, para tal investigação.

A morfina, analgésico de ação central, protótipo da classe dos opióides, foi o fármaco utilizado como controle positivo no teste da placa quente para verificar se havia algum comprometimento do efeito antinociceptivo do composto HC-030031 sobre o SNC. Os agonistas do receptores opióides constituem a principal classe de fármacos utilizadas no controle da dor moderada a intensa, e os locais de ação analgésica

compreendem o SNC e as terminações periféricas primárias (GRIFFIN & WOOLF, 2009).

O teste da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais, pois o calor é frequentemente utilizado como um estímulo nócico em modelos de dor aguda (ANTONIOLLI; VILLAR, 2003). Este teste é uma metodologia reconhecida por ser sensível a drogas que atuam a nível supraespinhal (CAMPOS et al., 2002; FRANÇA et al., 2001; PEANA et al., 2003). É um modelo animal que avalia a atividade antinociceptiva de fármacos opioides, mas outras drogas com atividade central, tais como sedativos e hipnóticas também apresentam atividade no modelo da placa quente (HIRUMA-LIMA et al., 2000).

O teste da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida a estímulos nocivos, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente a centros corticais, sendo que a resposta é proporcional a frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICRENSON, 1997). Estas fibras são estimuladas após a ativação dos receptores TRPV-1 limiar de ativação 43°C (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Em nosso estudo o grupo de animais tratados com morfina apresentou diferença significativa no tempo de latência de elevação das patas traseiras ou saltar retirando todas as patas do contato da placa quente em relação ao grupo controle. Porém o grupo tratado com o composto HC-030031 não apresentou diferença significativa no tempo de elevação das patas traseiras em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que o composto HC-030031 possui ação antinociceptiva visceral que parece ser destituído de um efeito central.

Eid e colaboradores (2008) demonstraram que o composto HC-030031 administrado por via oral em ratos foi efetivo em inibir a hipersensibilidade mecânica nos modelos de dor inflamatória e neuropática e que esse componente parece não ser resultante de um efeito central, conforme observado no teste da placa quente (EID et al., 2008). Nossos dados são consistentes com os daqueles pesquisadores quando demonstramos que o composto HC-030031, administrado por via oral, também apresentou de forma significativa um efeito antinociceptivo frente ao estímulo da placa quente.

Vários estudos mostram a participação do receptor TRPA1 nos processos de nocicepção inflamatória e neuropática. Na presente dissertação procuramos estudar o efeito antinociceptivo visceral do composto HC-03003 um antagonista seletivo do receptor TRPA1. Nosso trabalho inicialmente mostrou que o bloqueio do TRPA1 não apresentou efeito antiinflamatório, mas apresentou um importante efeito antinociceptivo visceral. Esse mecanismo parece envolver a modulação direta sobre fibras nociceptivas aferentes não envolvendo a participação de células residentes peritoneais, NO e sistema opióide. Esse efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 parece ser independente de uma ação central e não decorre de um comprometimento locomotor.

6 CONCLUSÕES

- O bloqueio do receptor TRPA1 pelo antagonista seletivo HC-030031 apresentou um importante efeito antinociceptivo visceral destituído de efeito antiinflamatório.
- O mecanismo do bloqueio do TRPA1 pelo HC-030031 parece envolver a modulação direta sobre fibras nociceptivas aferentes não envolvendo a participação de células residentes, óxido nítrico ou sistema opióide.
- O efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 parece ser independente de uma ação central.
- O efeito antinociceptivo visceral do HC-030031 na dose de 75 mg/Kg não depende de alterações sobre a atividade locomotora espontânea dos animais.

REFERÊNCIAS

- ALESSANDRI-HABER, N.; DINA, O. A.; JOSEPH, E. K.; REICHLING, D.; LEVINE, J. D. A Transient Receptor Potential Vanilloid-4 Dependent Mechanism of Hyperalgesia is Engaged by Concerted Action of Inflammatory Mediators. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 3864-3874, 2006.
- ALESSANDRI-HABER, N.; YEH, J. J.; BOYD, A. E.; PARADA, C. A.; CHEN, X.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Hypotonicity Induces TRPV4-Mediated Nociception In Rat. **Neuron**, v. 39, p. 497-511, 2003.
- ANTONIOLLI, A. R.; VILLAR, J. C. Atividade Antinociceptiva e Toxicidade aguda do Extrato Aguoso Vitex Agnus-castus L. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA FAP-SE, 2003, Aracaju. **Anais...Aracaju**, 2003.
- APOSTOLIDIS, A.; BRADY, C. M.; YIANGOU, Y.; DAVIS, J.; FOWLER, C. J.; ANAND, P. **Capsaicin Receptor TRPV1 in Urothelium of Neurogenic Human Bladders and Effect of Intravesical Resiniferatoxin.** *Urology*, v. 65, p. 400-405, 2005.
- BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious Cold ion Channel TRPA1 is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. **Neuron**, v. 41, p. 849-857, 2004.
- BARABARA, G.; STANGHELLINI, V.; DE GIORGIO, R.; CREMON, C.; COTRELL, G.S.; SANTINI, D.; PASQUINELLI, G. Activated Mas Cell in Proximity to Colonic Nervos Correlate With Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome. **Gastroenterology**, v. 126, p.693-702, 2004.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.
- BAUTISTA, D.M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.R.; READ, A.J.; POBLETE, J.; YAMOAHA, E.N.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. **Cell**, v.124, p. 1269-1282, 2006.
- BAUTISTA, D.M.; MOVAHED, P.; HINMAN, A.; AXELSSON, H.E.; STERNER, O.; HOGESTATT, E.D.; JULIUS, D.; JORDT, S.E.; AND ZYGMUNT, P.M. Pungent Products from Garlic Activate the Sensory Ion Channel TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p.12248-12252, 2005.
- BEERS, M. H. The Merck: Manual of Medical Information. Second Home Edition, on-line, version 2003. Disponível em: <<http://www.merck.com/mmhe/index.html>>. Acesso em: 12 fevereiro 2011.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and Spinal Mechanism of Nociception. **Physiology**, v.67, p.67-186, 1987.
- BESSON, P.; PERL, E.R. Responses of Cutaneous Sensory Units with Unmyelinated Fibers to Noxious Stimuli. **J. Neurophysiol.**, v.32, p.1025-1043, 1969.

BOETTGER, M. K.; UCEYLER, N.; ZELENKA, M.; SCHMITT, A.; REIF, A. Differences in Inflammatory Pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-Deficient Mice. **Eur. J. Pain**, v. 11, p. 810-818, 2007.

BUÉNO, L.; FIORAMONT, J.; GARCIA-VILLAR, R. Pathobiology of Visceral Pain: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications III. Visceral Afferent Pathways: a Source of New Therapeutic Targets for Abdominal Pain. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.278, p. G670–G676, 2000.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, J.; CLAUDINO, R.F. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **J. Br. Pharmacol.**, v.150, p. 727–737, 2007

CAMPOS, A.R.; ALBUQUERQUE, F.A.A.; RAO, V.S.N.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Investigation the Antinociceptive activity of Crude Extracts from Crotoncajucara leaves in Mice. **Fitoterapia**, v. 73, p.116-120, 2002.

CAPAZ, F. R.; VASCONCELLOS, L. E.; DE MORAES, S.; NETO, J. P. The Open Field: A Simple Method to Show Ethanol Withdrawal Symptoms. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 251, p.228-236, 1981.

CATERINA M.J.; JULIUS D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p.487-517, 2001.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. **Science**, v. 288, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in the Pain Pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-24, 1997.

CATTARUZZA F.; SPREADBURY I.; MORALES M.M.; GRADY E.F.; VANNER S.; BUNNETTI N.W. Transient Potential Ankyrin-1 has a Major Role in Mediating Visceral Pain in Mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 298, p. G81-G91, 2009.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M.A. Understanding the Signaling and Transmission of Visceral Nociceptive Events. **J. Neurobiol.**, v. 61, P. 45-54, 2004.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M.A. Visceral Pain. **Lancet**, v. 353, p.2145-2148, 1999.

CHEN, J. & KYM, P.R. TRPA1: The Species Difference. **J. Gen. Physiol.**, v. 133, n. 6, p. 623-625, 2009.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5) P2-mediated inhibition. *Nature*, v. 411, n. 6840, p. 957-62, 2001.

CLAPHAM, D.E. TRP Channels as Cellular Sensors. *Nature*, v.426, p.517-524, 2003.

COSENS, D. J.; MANNING, A. Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature*, v. 224, p.285-7, 1969.

COX, P.J. Cyclophosphamide cystitis: Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem. Pharmacol.*, v. 28, p.2045-2049, 1979.

CUNHA, T. M. **Mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides:** ativação da via de sinalização intracelular PI3K γ AKT/óxido nítrico. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DAI, Y.; WANG, S.; TOMINAGA, M.; YAMAMOTO, S.; FUKUOKA, T.; HIGASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, v. 117, n. 7, p. 1979-87, 2007.

DECIGA-CAMPOS, M.; LOPEZ-MUNOZ, F. J. Participation of the NO-cyclic GMP Pathway in Rofecoxib-Induced Antinociception. *Proc. West Pharmacol. Soc.*, v.46, p. 165-167, 2003.

DICKENSON, A.H. Spinal Cord Pharmacology of Pain. *Br. J. Anaesth.*, v.75, p.193-200, 1995.

DICKESON, A. H. Plasticity: Implications for Opioid and Other pharmacological Interventions in Specific Pain States. *Behav. Brain Sci.*, v.3, p. 392-403, 1997.

DOERNER, J. F.; GISSELMANN, G.; HATT, H.; WETZEL, C.H. Transient Receptor Potential Channel A1 Is Directly Gated by Calcium Ions. *J. Biol. Chem.*, n. 18, v. 282, p. 13180-13189, 2007.

DRAY, A.; URBAN, L. New Pharmacological Strategies for Pain Relief. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.36, p. 253-280, 1996.

[DU, S.](#); [ARAKI, I.](#); [KOBAYASHI, H.](#); [ZAKOJI, H.](#); [SAWADA, N.](#); [TAKEDA, M.](#)
Differential Expression Profile of Cold (TRPA1) and Cool (TRPM8) Receptors in Human Urogenital Organs. *Urology*, v. 72, p. 450-455, 2008.

EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. J. Synthetic Analgesic II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 107, p.385-393, 1953.

EID, S.; CROWN, E.D.; MOORE, E.L.; LIANG, H.A.; CHOONG, C.K.; HENSE, D.A.; KANE, S.A.; URBAN, M. HC-030031, a TRPA1 Selective Antagonist, Attenuates Inflammatory and Neuropathy-Induced Mechanical Hypersensitivity. *Mol. Pain*, v. 4, n. 48, 2008.

EL KOUHEN, R.; SUROWY, C.S.; BIANCHI, B.R.; NEELANDS, T.R.; MCDONALD, H.A.; NIFORATOS, W.; GOHTSYAN, A.; LEE, C.H.; HONORÉ, P.; SULLIVAN, J.P.; JARVIS, M.F.; FALTYNER, C.R. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethylbenzyl)-urea], a novel and selective transient receptor potential type V1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid. **J. Pharmac. Experim. Therap.**, v. 314, n.1, p.400-409, 2005.

EVERAERTS, W.; GEES, M.; ALPIZAR, T.A.; DEWACHTER, I.; LEUVEN, F.V.; VENNEKENS, R.; RIDDER, D.D.; NILIUS, B.; VOETS, T.; TALAVERA, K. The Capsaicin Receptor TRPV1 Is a Crucial Mediator of the Noxious Effects of Mustard Oil. **Current Biology**, v. 21, p. 316-321, 2011.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Induce Neutrophil Migration “in vivo” by Indirect Mechanism. **Agents Actions**, v. 3/4, p.344-349, 1990.

FANGER, C.M.; CAMINO, D.D.; MORAN, M.M. TRPA1 as an Analgesic Target. **J. Drug Discovery**, v. 2, p. 64-70, 2010.

FLEMING, R.A. An Overview of Cyclophosphamide and Ifosfamide Pharmacology. **Pharmacotherapy**, v.17, p.146S–154S, 1997.

FORMAN, A. S.; CHOU, J. STRICHARTZ, G. R.; LO, E. H. Farmacologia da Neurotransmissão Gabaérgica. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN-JUNIOR, A. R. ARMSTROMG, A.W. **Princípios de Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 11, p. 146-165.

FORSTER, A.B.; REEHI, P.W.; MESSLINGER, K.; FISCHER, M.J.M. High Concentrations of Morphine Sensitize and Activate Mouse Dorsal Root Ganglia via TRPV1 and TRPA1 Receptors. **Mol. Pain**, v. 5, p.1-10, 2009.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. B Vitamins Induce na Antinociceptive effect in The Acetic and Formaldehyde Models of Nociception in Mice. **Eur. J. Pharm.**, v. 421, p.157-164, 2001.

FRANCO, C.I.F.; MORAIS, L.C.S.L. QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; ANTONIOLLI, A.R. CNS Pharmacological Effects of the Hydroalcoholic Extrac of *Sida cordifolia* L. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p.275-279, 2005.

FREITAS, C. S. **Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da *Baccharis illinita* DC (Asteraceae)**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade do Paraná, 2009.

GAUDET, R. Divide and Conquer: High Resolution Structural Information on TRP Channel Fragments. **J. Gen. Physiol.**, v. 133, p. 231–237, 2009.

GEBHART, G.F. Visceral Nociception: Consequences, Modulation and the Future. **Eur. J. Anaesthesiol.**, v. 10, p. 24-27, 1995.

GEPPETTI, P.; TREVISANI, M. **Activation and Sensitisation of the Vanilloid Receptor: Role in Gastrointestinal Inflammation and Function.** *Br. J. Pharmacol.*, v. 141, p.1313-1320, 2004.

GRAY, K.J.; ENGELMANN, U.H.; JOHNSON, E.H.; FISHMAN, I.J.; Evaluation of Misoprostol Cytoprotection of the Bladder with Cyclophosphamide (Cytosan) Therapy. *J. Urol.*, v. 136, n. 6, p. 497-500, 1986.

GRIFFIN, A.G.; WOOLF, C.J. Farmacologia da Analgesia. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN-JUNIOR, A.H.; ARMSTRONG, E.J. ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap. 16, p.240-259.

GUHRING, H.; GORIG, M.; ATEES, M.; COSTE, O.; ZEILHOFER, H.U. Suppressed Injury-Induced Rise in Spinal Prostaglandin E2 Production and Reduced Early Thermal Hyperalgesia in iNOS-Deficient Mice. *J. Neurosci.*, v.20, p. 6714-6720, 2000.

GUHRING, H.; GORIG, M.; ATEES, M.; COSTE, O.; ZEILHOFER, H.U. Suppressed Injury-Induced Rise in Spinal Prostaglandin E2 Production and Reduced Early Thermal Hyperalgesia in iNOS-Deficient Mice. *J. Neurosci.*, v.20, p. 6714-6720, 2000.

HALES, C.A.; MUSTO, S.W.; JANSSENS, S.; JUNG, W.; QUINN, D.A.; WITTEN, M. Smoke aldehyde component influences pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.*, v.72, p.555-561, 1992.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat: I. Defecation and Urination as Measures of Individual Differences in Emotionality. *J. Comp. Psychol.*, v.18, p.385-403, 1934.

HANDWERKER, H.O.; KILO, S.; REEH, P.W. Unresponsive Afferent Nerve Fibers in the Sural Nerve of the Rat. *J. Physiol.*, v. 435, p. 229-242, 1991.

HARTENECK, C.; PLANT, T.D.; SCHULTZ, G. From Worm to Man: Three Subfamilies of TRP Channels. *Trends Neurosci.*, v. 23, p.159-66, 2000.

HINMAN, A.; CHUANG, H.H.; BAUTISTA, D.M.; JULIUS, D. TRP Channel Activation by Reversible Covalent Modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 103, p.19564-8, 2006.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GERMONSEN ROBINEOU, L.; SOUZA BRITO, A. R. M. The Juice of Fresh Leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) Merely Reduces Pain in Mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 71, p.267-274, 2000.

HJERLING-LEFFLER, J.; ALQATARI, M.; ERNFORS, P.; MARTIN KOLTZENBURG, T. Emergence of Functional Sensory Subtypes as Defined by Transient Receptor Potential Channel Expression. *J. Neurosci.*, n. 27, v.10, p.2435-2443, 2007.

HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J.O. Nitric Oxide Evokes Pain in Humans on Intracutaneous Injection. *Neurosci. Lett.*, v.165, p. 71-74, 1994.

IASP. International Association for the study of Pain, 2008. Disponível em:<<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 10 Jan. 2011.

JARA-OSEGUERA, A.; SIMON, S.A.; ROSENBAUM, T. Trpv1: On The Road to Pain Relief. **Curr. Mol. Pharmacol.**, v. 1, p. 255-69, 2008.

JEFTINIJA, S.; JEFTINIJA, K.; LIU, F.; SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; LARSON, A.A. Excitatory Amino Acids are Released from Rat Primary Afferent Neurons *in vitro*. **Neurosc. Lett.**, v. 125, p.191-194, 1991.

JOHANEK, L.M.; MEYER, R.A.; FRIEDMAN, R.M.; GREEQUIST, K.W. SHIM, B.; BORZAN, J.; HARTKE, T.; LAMOTTE, R.H.; RINGKAMP, M. A Role for Polymodal C-Fiber Afferents in Nonhistaminergic Itch. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 7659-7669, 2008.

JORDT, J. E.; BAUTISTA, D.; CHUANG, H.H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibers Through the TRP Channel ANKTMI. **Nature**, v. 427, p. 260-265, 2004.

JORDT, S.E; BAUTISTA, D.M.; CHUANG, H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibres Through the TRP Channel ANKTMI. **Nature**, v. 427, p. 260-265, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KARASHIMA, Y.; DAMANN, N.; PRENEN, J.; TALAVERA, K.; SEGAL, A.; VOETS, T.; NILIUS, B. Bimodal Action of Menthol on the Transient Receptor. **J. Neurosci.**, v. 27, n° 37, p. 9874-9884, 2007.

KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock Down of TRPA1, but not TRPM8, Alleviates Cold Hyperalgesia After Spinal Nerve Ligation in Rats. **Exp. Neurol.**, v. 200, p. 112-123, 2006.

KERSTEIN, P.; CAMINO, D.; MORAN, M.M.; STUCKY, C.L. Pharmacological Blockade of TRPA1 Inhibits Mechanical Firing in Nociceptors. **Mol. Pain**, v. 5, n° 19, p. 20-32, 2009.

KIM, Y.S.; SON, J.Y.; KIM, T.H.; PAIK, S.K.; DAI, Y.; NOGUCHI, K.; AHN, D.K.; BAE, Y.C. Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in the Rat Trigeminal Sensory Efferents and Spinal Dorsal Horn. **J. Comp. Neurol.**, v.518, n.5, p.687-698, 2010.

KOBAYASHI, Y. The Nociceptive and Anti-Nociceptive Effects of Evodiamine from Fruits of *Evodia Rutaecarpa* in Mice. **Plant. Med.**, v. 69, p. 425-428, 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for Analgesic Screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KRAYCHETE, D.C.; GUIMARÃES, A.C. Hiperalgesia Visceral e Dor Abdominal Crônica: Abordagem Diagnóstica e Terapêutica. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, n. 53, v. 6, p. 833-853, 2003.

KWAN K.Y.; ALLCHORNE, A.J.; VOLLRATH, M.A.; CHRISTENSEN, A.P.; ZHANG, D.S.; WOOLF, C.J.; COREY, D.P. TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, Chemical Nociception but is Not Essential for Hair-Cell Transduction. **Neuron**, v. 50, p.277-289, 2006.

KLIONSKY, L.; TAMIRI, R.; GAO, B.; WANG, W.; IMMKE, D.C.; NISHIMURA, N.; GAVVA, N.R. Species-specific Pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl Benzamides as Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Antagonists. **Mol. Pain.**, v. 3, n. 39, p.1-11, 2007.

KWAN, K.Y.; GLAZER, J.M.; COREY, D.P.; RICE, F.L.; STUCKY, C.L. TRPA1 Modulates Mechanotransduction in Cutaneous Sensory Neurons. **J. Neurosci.**, v. 29, n° 15, p.4808-4819, 2009.

LAIRD, J.M. Excitability Changes of Somatic and Viscerosomatic Nociceptive Reflexes in the Decerebrate-Spinal Rabbit: Role of NMDA Receptors. **J. Physiol.**, v.489, p.545-555, 1995.

LAIRD, J.M.A.; CARO-MARTINEZ, L.; NICAS-GARCIA, E.; CERVERO, F. A New Model of Visceral Pain Referred Hyperalgesia in the Mouse. **Pain**, v. 92, p. 335-342, 2001.

LAMOTTE, R.H.; SHAIN, C.N.; SIMMONE, D.A.; TSAI, E. F. Neurogenic Hyperalgesia: Psychophysical studies of Underlying Mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v.66, p.190-211, 1991.

LATORRE, R.; ZAELZER, C.; BRAUCHI, S. Structure-Functional Intimacies of Transient Receptor Potential Channels. **Biophys**, v. 42, p. 201-246, 2009.

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Calcitonin Gene Related Peptide Immunoreactivity and Afferent Receptive Properties of Dorsal Root Ganglion Neurons in Guinea-Pigs. **J. Physiol.**, v. 540, p. 989-1002, 2002.

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Relationship of Substance P to Afferent Characteristics of Dorsal Root Ganglion Neurons in Guinea-Pigs. **J. Physiol.**, v. 505, p. 177-191, 1997.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1772, p.989-1003, 2007.

LIEDTKE, W.; SIMON, S.A. A possible Role for TRPV4 Receptors in Asthma. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 287, p. 269-271, 2004.

LIMA JÚNIOR, R.C.P. Efeito Antinociceptivo da Mistura de Triterpenos Pentacíclicos α - e β - Amirina em Modelos de Nociceção Visceral em Camundongos. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LIMA, M.V.; FERREIRA, F.V.; MACEDO, F.Y. Histological changes in bladders of patients submitted to ifosfamide chemotherapy even with mesna prophylaxis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.5, p.643-650, 2007.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, n. 3, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

LOPEZ-MUNOZ, F. J.; DIAZ-REVAL, M. I.; TERRON, J. A.; DECIGA-CAMPOS, M. Analysis of the Analgesic Interactions Between Ketorolac and Tramadol During Arthritic Nociception in Rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 484, p. 157-165, 2004.

LOPE-RODRIGUES, M.L.; VISO, A.; ORTEGA, GUTIERREZ, S.VR1 receptor modulators as potential drugs for neuropathic pain. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.3, n.7, p.729-748, 2003.

LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. **Ann. Intern. Med.**, v.120, p. 227-237, 1994.

MACEDO, F.Y.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA, P.R; TAVORA, F.; FERREIRA, F.V., SCHMITT, F.C.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 Expression on Ifosfamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 134, p. 19-27, 2008.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia Funcional**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

MACPHERSON, L.J.; DUBIN, A.E.; EVANS, M.J.; MARR, F.; SCHULTZ, P.G.; CRAVATT, B.F.; PATAPOUTIAN, A. Noxious Compounds Activate TRPA1 Ion Channels Through Covalent Modification of Cysteines. **Nature**, v. 445, p.541-545, 2007.

MACPHERSON, L.J.; GEIERSTANGER, B.H.; VISWANATH, V.; BANDELL, M.; EID, S.R.; HWANG, S.; PATAPOUTIAN, A. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. **Curr. Biol.**, v.15, p.929-934, 2005.

MAGGI, C.A.; LECCI, A.; SANTICIOLI, P.; DEL BIANCO, E.; GIULIANI, S. Cyclophosphamide Cystitis in Rats: Involvement of Capsaicin-Sensitive Primary Afferents. **Auton. Nerv. Syst.**, v. 38, p. 201-208, 1992.

MCGARAUGHTY, S.; CHU, K.L.; PERNER, R.J.; DIDOMENICO, S.; KORT, M.E.; KYM, P.R. TRPA1 Modulation of Spontaneous and Mechanically Evoked Firing of Spinal Neurons in Uninjured, Osteoarthritic, and Inflamed Rats. **Mol. Pain.**, v. 6, n. 14, p. 1-11, 2010.

MAJEWSKI, M.; SIENKIEWICZ, W.; KALECZYC, J.; MAYER, B.; CZAJA, K. The Distribution and Co-Localization of Immunoreactivity to Nitric Oxide Synthase, Vasoactive Intestinal Polypeptide and Substance P Within Nerve Fibres Supplying Bovine and Porcine Female Genital Organs. **Cell Tissue Res.**, v. 281, p. 445-464, 1995.

MARQUES, J. O. Dor: Diagnóstico e Tratamento. In: _____. **Bases de Anatomia e Fisopatologia**. São Paulo: Ed. Âmbito, 2004.

MARTINEZ-VENTURA, R.; CAMPOS, M.B.; DIAZ-REVAL, M.I.; GONZALEZ-TRUJANO, M.E.; LOPEZ-MUNOZB, F.J. Peripheral Involvement of the Nitric Oxide–cGMP Pathway in the Indomethacin-Induced Antinociception in Rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.503, p. 43-48, 2004.

MATTHEWS, P.J.; AZIZ, Q.; FACER, P.; DAVIS, J.B.; THOMPSON, D.G.; ANAND, P. **Increased Capsaicin Receptor TRPV1 Nerve Fibres in the Inflamed Human Esophagus.** *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 16, p. 897-902, 2004.

MCNAMARA, C.R.; BREHM, J.M.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, A.J.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. Trpa1 Mediates Formalin-Induced Pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n.33, v. 104, P.13524-13530 2007.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric Oxide and Nociceptive Processing in the Spinal Cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.

MEYER, R.A.; DAVIS, K.D.; COHEN, R.H.; TREEDE, R.D.; CAMPBELL, J.N. Mechanically Insensitive Afferents in Cutaneous Nerves of Monkey. **Brain Res.**, v. 561, p. 252-261, 1991.

MILLAN, M.J. The Induction of Pain: an Integrative Review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and Protective Roles of Glia in Chronic Pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

MIYAMOTO, T.; DUBIN, A.E.; PETRUS, M.J.; PATAPOUTIAN, A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS One**, v.4, n.10, p.7596, 2009.

MONTELL, C. The TRP Superfamily of Cation Channels. **Sci. STKE**, v. 272, p. re3, 2005.

MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L.; FLOCKERZI, V. The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. **Cell**, v.108, p. 595-598, 2002.

MONTELL, C.; RUBIN, G.M. Molecular Characterization of the Drosophila TRP Locus: a Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. **Neuron**, v. 2, p. 1313-1323, 1989.

NAGATA, K.; DUGGAN, A.; KUMAR, G.; GARCIA-ANOVEROS, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J. Neurosci.**, n. 25, v. 16, p. 4052-4061, 2005.

NATHAN, J.D.; PENG, R.Y.; WANG, Y.; MCVEY, D.C.; VIGNA, S.R.; LIDDLE, R.A. **Primary Sensory Neurons: A Common Final Pathway for Inflammation in Experimental Pancreatitis in Rats.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 283, p. G938-946, 2002.

NELSON, P.L.; BECK, A.; CHENG, H. Transient Receptor Proteins Illuminated: Current views on TRPs and disease. **Vet. J.**, 2010.

NESS, T.J. Models of Visceral Nociception. **ILAR J.**, v. 40, 1999.

NICOL, D. Cyclophosphamide and the Urinary tract. **Intern. Med. J.**, v. 32, p.199-201, 2002.

NILIUS, B.; VOET, S T.; PETERS, J. TRP Channels in Disease. **Sci. STEKE**, v. 8, p.295, 2005.

NILIUS, B.; VOETS, T.; TRP Channels: a TRP Though a world of Multifunctional Cation Channels. **Pflugers Arch.**, v. 451, p.1-10, 2005a.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J.A. Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p.165-217, 2007.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DMAREST, R.J. **The human nervous system: structure and function: pain and temperature.** 5th ed. New York: Wiliamns & Wilkins,1996.

OBATA, K.; KATSURA, H.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI,K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI,K. Trpa1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n.9, p. 2393-2401, 2005.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K.H.; BERBEROGLU, H. Effects of *Hypericum perforatum* L. *Hypericum calycinum* L. Extracts on the Central Nervous System in Mice. **Phytomedicine**, v. 3, p.139-146, 1996.

PALMER, C.P.; AYDAR, E.; DJAMGOZ, M.B.A. A Microbial TRP-like Polycystic-Kidney-Disease-Related Ion Channel Gene. **J. Biochem.**, v. 387, p. 211-219, 2005.

PARK, C.K.; KIM, M.S.; FANG, Z.; LI, H.Y.; JUNG, S.J.; CHOI, S.Y.; LEE, S.J.; PARK, K.; KIM, J.S.; OH, S.B.; **Functional Expression of Thermo-Transient Receptor Potential Channels in Dental Primary Afferent Neurons: Implication For Tooth Pain.** **J. Biol. Chem.**, v. 281, p.17304-17311, 2006.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient Receptor Potential Channels: Targeting Pain at the Source. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; CHESSA, M.L.; MORETTI, M.D.L.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool Produces Antinociception in Two Experimental Models of Pain. **Eur. J. Pharm.**, v. 460, p. 37-41, 2003.

PETRUS, M.; PEIER, A.M.; BANDELL, M.; HWANG, S.W.; HUYNH, T.; OLNEY, N.; JEGLA, T.; PATAPOUTIAN, A. A Role of TRPA1 in Mechanical Hyperalgesia is Revealed by Pharmacological Inhibition. **Mol. Pain**, v. 3, n. 40, p. 320-329, 2007.

PHELPS, C.B.; GAUDET, R. The Role of the Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. **J. Biol. Chem.**, v.50, n. 282, p. 36474-36480, 2007.

PHILLIPS, A.M.; BULL, A.; KELLY, L.E. Identification of a Drosophila Gene Encoding a Calmodulin-Binding Protein With Homology to the TRP Phototransduction Gene. **Neuron**, v. 8, p.631- 642, 1992.

PLANELLAS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; MORENILLA-PALAO, C.; FERRER-MONTIEL, A. **Functional Aspects and Mechanisms of TRPV1 Involvement in Neurogenic Inflammation that Leads to Thermal Hyperalgesia.** *Pflugers Arch.*, v. 451, p. 151-159, 2005.

PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical Aspects of Chronic Pain and its Relationship to Treatment. **Pharm. Therap.**, v. 71, p. 313-324, 1996.

PORTH, C.M. **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PRUDENTE, A. **Saúde em Movimento**. [S.l]: Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer e Dr. Heinz Konrad, 2004. Disponível em: <www.saudeemmovimento.com.br/conteudos/conteudo>. Acesso em: 05 mar. 2006.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The Open Field as a Paradigm to Measure the Effects of Drugs on Anxiety-Like Behaviors: A Review. **Eur. J. Pharm.**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RIBEIRO, R.A.; FREITAS, H.C. CAMPOS, M.C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; CUNHA, F.Q. Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1 beta mediate the Production of Nitric Oxide Involved in the Pathogenesis of Ifosfamide Induced Hemorrhagic Cystitis in Mice. **J. Urol.**, v. 167, n. 5, p.2229-2239, 2002.

RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SANTOS, C.C.; LIMA, M.M.P.; BALLEJO, G.; CUNHA, F.Q.; Involvement of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor in the Pathogenesis of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis. In: INTERN CANCER CONGRESS, 17th, Italy **Proceedings**, Italy, 1998. p.227-231.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOLATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of Resident Macrophages and Mast Cells in the Writhing Nociceptive Response Induced by Zymosan and Acetic Acid in Mice. **Eur. J. Pharm.**, v. 387, p. 111-118, 2000.

SANOJA, R.; TORTORICI, V.; FERNANDEZ, C.; PRICE, T.J.; CERVERO, F. Role of RVM Neurons in Capsaicin-evoked Visceral Nociception and Referred Hyperalgesia. **J. Pain**, v. 14, p. 120.e1-120.e9, 2010.

SCHMELZ, M.; PETERSEN, L.J. Neurogenic Inflammation in Human and Rodent Skin. **News Physiol. Sci.**, v.16, p. 33-37, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. 2009. Disponível em: <www.dor.org.br/dor_impactos.asp>. Acesso em: 12 jan. 2011.

SOJA, P. J.; TAEPAVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B. E.; MCERLANE, S. A.; FRAGOSO, M. C. Transmission Through the Dorsal Spinocerebellar and Spinoreticular Tracts: Wakefulness Versus Thiopental Anesthesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p. 1178-1188, 2002.

SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil Migration Induced by Inflammatory Stimuli is Reduced by Macrophage Depletion. **Agents Actions**, v. 24, p. 377-380, 1998.

STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of Nitric Oxide and its Redox-Activated Forms. **Science**, v. 258, p. 1898-1902, 1992.

STORY, G. M.; PEIER, A. M.; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S. PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, is Activated by Cold Temperatures. **Cell**, v. 112, p.819-829, 2003.

TAI, C.; ZHU, S.; ZHOU, N. TRPA1: The Central Molecule for Chemical Sensing in Pain Pathway? **J. Neurosci.**, n.28, v.5, p.1019-102, 2008.

TAKAMOTO, S.; SAKURA, N.; NAMERA, A.; YASHIKI, M. Monitoring of Urinary Acrolein Concentration in Patients Receiving Cyclophosphamide and Ifosfamide. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 806, p.59-63, 2004.

TAYLOR-CLARK, T.E.; MCALEXANDER, M.A.; NASSENSTEIN, C.; SHEARDOWN, S.A.; WILSON, S.; THORNTON, J.; CARR, M.J.; UNDEM, B.J. Relative Contributions of TRPA1 and TRPV1 Channels in the Activation of Vagal Bronchopulmonary C-Fibres by the Endogenous Autacoid 4-Oxononenal. **J. Physiol.**, v. 586, p. 3447- 3459, 2008.

THEOHARIDES, T.C.; PANG, X.; LETOURNEAU, R.; SANT, G.R.; Interstitial Cystitis : Neuroimmunoendocrine Disorder. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 840, p. 619-634, 1989.

THOMAZZI, S. M. **Participação de macrófagos e citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais.** Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

TODAKA, H.; TANIGUCHI, J.; SATOH, J.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M. **Warm Temperature-Sensitive Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Plays an Essential Role in Thermal Hyperalgesia.** **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 35133-35138, 2004.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J. **Thermosensation and Pain.** **J. Neurobiol.**, v. 61, p. 3-12, 2004.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain perception and its Modulation. **Neuron**, v. 55, p 377-391, 2007.

TREVISANI, M.; SIEMENS, J.; MATERAZZ, I. S.; BAUTISTA, D.M.; NASSINI, R.; CAMPI, B.; IMAMACHI, N.; ANDRE, E.; PATAACCHINI, R.; COTTRELL, G.S.; GATTI, R.; BASBAUM, A.I.; BUNNETT, N.W.; JULIUS, D.; GEPPETTI, P. 4-Hydroxynonenal, na Endogenous Aldehyde, Causes Pain and Neurogenic Inflammation Through Activation of the Irritant Receptor TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p.13519–13524, 2007.

TURK, D.C.; RUDY, T.E. Classification Logic and Strategies in Chronic Pain. In: TURKY, D.C.; MELZAK, R. (Ed.). **Handbook of pain assessment**. New York. Guilford Press, 1992.
TYMPANIDIS, P.; CASULA, M.A.; YIANGOU, Y.; TERENGGHI, G.; DOWD, P.; ANAND, P. **Increased Vanilloid Receptor VR1 Innervation in Vulvodynia**. *Eur. J. Pain*, v. 8, p. 129-133, 2004.

VALE, L.M.; ROLIM, D.E.; CAVALCANTE, I.F.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. Role of NO-GMPc/K(ATP) Pathway in the Antinociceptive Effect of Sildenafil in Zymosan Writhing Response in Mice. **Inflamm. Res.**, v. 56, p. 83-88, 2007.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of Pain. **Med. Clin. North Am.**, v. 91, p. 1-12, 2007.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP Channels. **Annu. Rev. Biochem.**, v.76, p. 387-417, 2007.

VIZZARD, M.A.; ERDMAN, S.L.; GROAT, W.C. Increased Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Dorsal Root Ganglion Neurons After Systemic Capsaicin Administration. **Neuroscience**, v. 67, p.1–5, 1995.

WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. **Edinburgh**: Churchill Livingstone, 1999.

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v. 131, n. Pt 5, p. 1241-51, 2008.

WANG, S.Y.D.; TOMINAGA, M.; YAMAMOTO, S.; FUKUOKA, T.; HIGASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 Contributes to the sensation of Inflammatory Pain. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1979-1987, 2007.

WALKER, K.M.; URBN, L.; MEDHURST, J.; PATEL, S.; PANESR, M.; FOX, A.J.; MCINTYRE, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **J. Pharmac Experim Therap**, v.304, n.1, p.56-62, 2003.

WANG, Z.-Y.; WANG, P.; MERRIAM, F.V.; BJORLING, D.E. Lack of TRPV1 Inhibits Cystitis-induced Increased Mechanical Sensitivity in Mice. **Pain**, v. 139, p. 158-167, 2008.

WEI, H.; HAMALAINEN, M.M.; SAARNILEHTO, M.; KOIVISTO, A.; PERTOVAARA, A. Attenuation of Mechanical Hypersensitivity by an Antagonist of the TRPA1 ion Channel in Diabetic Animals. **Anesthesiology**, v. 111, n.1, p.147-154, 2009.

WES, P.D.; CHEVESICH, J.; JEROMIN, A.; ROSENBERG, C.; STETTEN, G.; MONTELL, C. TRPC1, a Human Homolog of a Drosophila Store-Operated Channel. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 9652-9656, 1995.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, 2007.

XU, H.; BLAIR, N.T.; CLAPHAM, D.E. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. **J. Neurosci.**, v. 25, n.39, p.8924-8937, 2005.

YAKSH, T.L. Central Pharmacology of Nociceptive Transmission. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. 5th ed. Edinburgo: Elsevier Churchill Livingstone, 2006. p. 371-414.

YANG, J.; LI, Y.; ZUO, X.; ZHEN, Y.; YU, Y.; GAO, L. Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Participates in Visceral Hyperalgesia Following Experimental Colitis. **Neurosci. Lett.**, v. 440, n, 3, p.237-241, 2008.

YU, S.; GAO, S.; PETERSON, B.Z.; OUYANG, A. TRPA1 in Mast Cell Activation-Induced Long-Lasting Mechanical Hypersensitivity of Vagal Afferent C-fibers in Guinea Pig Esophagus. **J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 297, p. G34-G42, 2009.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; DYER, N.H.; CHAN, C.L.; KNOWLES, C.; WILLIAMS, N.S.; ANAND, P. **Vanilloid Receptor-1 Immunoreactivity in Inflamed Human Bowel. Lancet**, v. 357, p. 1338-1339, 2001.

YI, D.; WANG, S.; TMINAGA, M.; YAMAMOTO, S.; FUKUOKA, T.H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J. Clin. Invest.**, v. 117, P.1979-1987, 2007.

ZOCHODNE, D.W.; LEVY, D. Nitric Oxide in Damage, Disease and Repair of the Peripheral Nervous System. **Cell Mol. Biol.**, v, p. 51: 255-267, 2005

ZURBORG, S.B.; YURGRONOR, J.A.; CASPANI, P.A.; HEPPENSTALL. The Ion Channel TRPA1 by Ca²⁺. **Nat. Neurosci.**, v. 10, p.277-279, 2007.