

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR VANILOIDE NA
NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO
PERIFÉRICA DE POLIAMINAS EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila de Campos Velho Gewehr

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR VANILOIDE NA
NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO PERIFÉRICA DE
POLIAMINAS EM CAMUNDONGOS**

Camila de Campos Velho Gewehr

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientador: Prof. Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brazil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR VANILOIDE NA NOCICEPÇÃO
INDUZIDA PELA INJEÇÃO PERIFÉRICA DE POLIAMINAS EM
CAMUNDONGOS**

elaborada por
Camila de Campos Velho Gewehr

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Juliano Ferreira, Dr.
(Orientador)**

Maria Ester Pereira, Dra. (UFSM)

Eunice André, Dra. (UFRN)

Santa Maria, 2 de dezembro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha avó, ao meu irmão e ao meu namorado, por sempre apoiarem minhas escolhas e por proporcionarem plenas condições para concretizar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e avó, Paulo Roberto, Maria Cristina e Izara, pelo incentivo e por serem a base de todas as minhas conquistas.

Ao meu irmão, Fernando, pelo carinho e compreensão de sempre.

Ao meu namorado, Kenji, pela paciência, companheirismo, apoio e dedicação durante todos esses anos juntos.

À Dinda Teca e à Letícia, pelo incentivo e exemplo de docência a ser seguido.

Às minhas queridas cunhadas, Aninha e Gitane, pela compreensão e amizade.

Ao professor Juliano Ferreira, pelos ensinamentos de tudo o que sei em pesquisa e pela dedicação para o desenvolvimento deste trabalho. Sem ele não seria possível concretizar esta etapa. *Minha eterna admiração!*

Aos colegas e amigos do LABNEURO, pelos inúmeros momentos agradáveis durante o período de trabalho e companheirismo no laboratório.

Às minhas amigas amadas Karina Danieli, Gabriela Hirsch, Karine de Bona, Jaqueline Moura, Aline Bopp, Juliana Saldanha, pelos inúmeros momentos de união, apoio e compreensão.

À minha amiga Gabriele Donicht, pelo exemplo de dedicação e inspiração profissional.

Às professoras Eunice André e Maria Ester Pereira, pelo tempo disponibilizado para leitura e avaliação do presente trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Farmacologia da UFSM que, de alguma maneira, participaram e contribuíram para minha formação.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de realização deste curso, bem como à CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que diretamente ou indiretamente fizeram parte deste trabalho. *Meu sincero agradecimento!*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR VANILOIDE NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO PERIFÉRICA DE POLIAMINAS EM CAMUNDONGOS

Autor: Camila de Campos Velho Gewehr

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da defesa: Santa Maria, 2 de dezembro de 2010.

As poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) são importantes reguladores endógenos de canais iônicos como o receptor vaniloide (TRPV1), os receptores glutamatérgicos (NMDA ou AMPA/cainato) e o canal iônico sensível ao ácido (ASIC). No presente estudo, investigou-se o possível efeito nociceptivo induzido por poliaminas e o mecanismo envolvido nesta nocicepção *in vivo* e *in vitro*. A injeção subcutânea (s.c.) de capsaicina, espermina, espermidina e putrescina produziram nocicepção com DE_{50} de 0,16 (0,07-0,39) nmol/pata, 0,4 (0,2-0,7) μ mol/pata, 0,3 (0,1-0,9) μ mol/pata e 3,2 (0,9-11,5) μ mol/pata, respectivamente. Os antagonistas dos receptores NMDA (MK801, 1 nmol/pata), AMPA/cainato (DNQX, 1 nmol/pata) ou ASIC (amiloride, 100 nmol/pata) não reduziram a nocicepção induzida por espermina. Porém, os antagonistas do receptor TRPV1 capsazepina (1 nmol/pata) e SB366791 (10 nmol/pata) reduziram a nocicepção induzida por espermina, com inibições de 81 ± 10 e $68 \pm 9\%$, respectivamente. A dessensibilização prévia com resiniferatoxina (RTX) reduziu a nocicepção induzida por espermina e a expressão de TRPV1 no nervo ciático, com reduções de $82 \pm 9\%$ e $67 \pm 11\%$, respectivamente. Além disso, a combinação de espermina (1 nmol/pata) e RTX (0,005 fmol/pata), em doses que separadamente não são eficientes em induzir nocicepção, produziu comportamento nociceptivo. Finalmente, diferentes concentrações de espermina (3-300 μ M) aumentaram a ligação específica de [3 H]-RTX ao receptor TRPV1. Assim, os resultados demonstram que poliaminas produzem efeito nociceptivo espontâneo através da estimulação de receptor TRPV1, mas não de receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou canal iônico sensível a ácido.

Palavras-chave: poliaminas, analgésico, canais iônicos, dor, capsaicina.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduation Program of Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

CONTRIBUTION OF VANILLOID RECEPTOR TO THE NOCICEPTION INDUCED BY PERIPHERAL INJECTION OF SPERMINE IN MICE

Author: Camila de Campos Velho Gewehr

Advisor: Juliano Ferreira

Place and Date: Santa Maria, 2 de dezembro de 2010.

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are important endogenous regulators of ion channels, such as vanilloid (TRPV1), glutamatergic (NMDA or AMPA/kainate) and acid-sensitive (ASIC) receptors. In the present study, it was investigated the possible nociceptive effect induced by polyamines and the mechanisms involved in this nociception *in vivo* and *in vitro*. The subcutaneous (s.c.) injection of capsaicin, spermine, spermidine or putrescine produced nociception with ED₅₀ of 0.16 (0.07-0.39) nmol/paw, 0.4 (0.2-0.7) μ mol/paw, 0.3 (0.1-0.9) μ mol/paw and 3.2 (0.9-11.5) μ mol/paw, respectively. The antagonists of NMDA (MK801, 1 nmol/paw), AMPA/kainate (DNQX, 1 nmol/paw) or ASIC receptors (amiloride, 100 nmol/paw) failed to reduce the spermine-triggered nociception. However, the TRPV1 antagonists capsazepine or SB366791 (1 nmol/paw) reduced spermine-induced nociception, with inhibition of 81 \pm 10 and 68 \pm 9%, respectively. The previous desensitization with resiniferatoxin (RTX) largely reduced the spermine-induced nociception and TRPV1 expression in the sciatic nerve, with reductions of 82 \pm 9% and 67 \pm 11%, respectively. Furthermore, the combination of spermine (100 nmol/paw) and RTX (0.005 fmol/paw), in doses which alone were not capable of inducing nociception, produced nociceptive behaviors. Moreover, different concentrations of spermine (3-300 μ M) enhanced the specific binding of [3H]-RTX to TRPV1 receptor. Altogether, polyamines produce spontaneous nociceptive effect through the stimulation of TRPV1, but not of ionotropic glutamate or ASIC receptors.

Key words: polyamines, analgesic, ionic channel, pain, capsaicin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ASIC	Canal iônico sensível a ácido
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
DE50	Dose efetiva 50
DFMO	Difluormetilornitina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	Ácido dietilaminotetraacético
g	Gramas
NMDA	N-metil-D-aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliamina oxidase
RTX	Resiniferatoxina
SSAT	N1-acetiltransferase
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilase
SB366791	N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamida
s.c.	Subcutâneo
SDS-PAGE	Gel de eletroforese em poliacrilamida de sódio dodecil sulfato
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide 1
TG	Gânglio trigeminal
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
μ M	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Estrutura das poliaminas.....	22
Figura 2 – Síntese das poliaminas.....	23

Manuscrito

Figure 1 – Dose–response curves for the overt nociception caused by s.c. injection of capsaicin (0.01-3 nmol/paw), spermine (100-2000 nmol/paw), spermidine (100-2000 nmol/paw) or putrescine (1000-10000 nmol/paw) in mice.....	52
Figure 2 – Effect of s.c. co-treatment with the selective NMDA receptor antagonist MK 801 (1 nmol/paw) or AMPA/kainate receptor antagonist DNQX (1 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, A e C) or glutamate-induced nociception (10000 nmol/paw, B e D).....	53
Figure 3 - Effect of co-treatment with the acid-sensitive ion channel (ASIC) blocker amiloride (100 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, s.c.)-induced nociception in mice.....	54
Figure 4 - Effect of s.c. co-treatment with the TRPV1 receptor antagonists capsazepine (0.1-1 nmol/paw) or SB366791 (0.3-10 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, A e C) or capsaicin-induced nociception (1 nmol/paw, B e D).....	55
Figure 5 - Western blot analysis showing TRPV1 expression in sciatic nerve (A) after systemic treatment with RTX (50 mg/kg, s.c.) or with vehicle. Effect of RTX desensitization (50 mg/kg, s.c.) on spermine (3 µg/paw, s.c.)-induced nociception in mice (B).....	56
Figure 6 - Specific bind of [³ H] resiniferatoxin in spinal cord membranes of mice in absence or presence of spermine (3 - 300 µM) in vitro (A). Nociceptive effect caused by the s.c. co-injection of low doses of spermine (100 nmol/paw) with resiniferatoxin (0.005 nmol/paw) (B).....	56

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	11
2	INTRODUÇÃO	13
3	OBJETIVOS	16
	3.1 Objetivo geral	17
	3.2 Objetivos específicos	17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
	4.1 Dor	19
	4.2 Poliaminas	21
5	RESULTADOS	29
	5.1 Manuscrito	30
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	66
8	REFERÊNCIAS	68

1 APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo. As seções Materiais e Métodos e Resultados, encontram-se no próprio artigo.

Os itens Discussão, Conclusões e Referências encontram-se no final desta dissertação.

As Referências dizem respeito apenas às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura e Discussão desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica “The Journal of Pain”, à qual foi submetido e se encontra no item resultados.

2 INTRODUÇÃO

A dor é uma das causas mais frequentes da procura por serviços de saúde e auxílio médico. Ela pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial ou de fato (LOESER; TREEDE, 2008). Em indivíduos saudáveis, a dor aguda manifesta-se como um alerta para que não ocorra dano tecidual, por exemplo, contato com objetos quentes (WATKINS; MAIER, 2002). Além desse propósito protetor, a dor pode tornar-se crônica quando o organismo não consegue solucionar a lesão (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

Após alguma lesão tecidual, vários mediadores químicos são produzidos ou liberados, tais como: citocininas, fatores de crescimento, cininas, purinas, aminas, prostanoídes e íons como, por exemplo, prótons. Esses mediadores interagem com receptores ou canais iônicos das terminações nervosas sensoriais, promovem excitabilidade neuronal e participam da transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (JULIUS; BASBAUM, 2001). Interessantemente, as poliaminas são moléculas endógenas capazes de modular a atividade de canais iônicos (WILLIAMS, 1997); assim, poderiam possuir um papel relevante na produção da dor (JULIUS; BASBAUM, 2001).

As poliaminas mais importantes encontradas nos mamíferos são: putrescina, espermidina e espermina. Todas são aminas alifáticas, inicialmente formadas por descarboxilação da ornitina, uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) (SEILER; DELCROS; MOULINOX, 1996). O controle da excitabilidade neuronal por essas moléculas está relacionado com a interação com canais iônicos (SCOTT; SUTTON; DOLPHIN, 1993). Alguns estudos demonstraram que as poliaminas podem modular receptores glutamatérgicos, tais como: o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), o receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e o receptor cainato no SNC (SCOTT; SUTTON; DOLPHIN, 1993; WILLIAMS, 1997). As poliaminas também podem modular o canal iônico sensível ao ácido (ASIC) (BABINI *et al.*, 2002) e o receptor vaniloide (TRPV1) (AHERN; WANG; MIYARES, 2006). Todos esses receptores são expressos por terminações nervosas periféricas nociceptivas (JULIUS; BASBAUM, 2001). No entanto, não se conhece o papel das poliaminas na excitação das terminações. Curiosamente foram encontrados níveis aumentados dessas moléculas em tecido e líquido sinovial de pacientes com artrite (YUKIOKA *et al.*, 1992), o que sugere sua ação na indução da dor. Assim, descobrir a ação das poliaminas nos tecidos

periféricos, bem como o envolvimento dessas substâncias com os canais iônicos, presentes nas fibras aferentes primárias nociceptivas, pode contribuir para a descoberta de novos alvos para o tratamento da dor, principalmente em processos inflamatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel das poliaminas periféricas na nocicepção *in vivo*, bem como seu mecanismo nesta ação, em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- 1 - Verificar o efeito nociceptivo induzido pela administração periférica das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) em camundongos.
- 2 - Elucidar o papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato), do receptor ASIC e do receptor TRPV1 na ação nociceptiva induzida por espermina em camundongos.
- 3 - Avaliar o envolvimento das fibras aferentes primárias TRPV1 positivas na nocicepção induzida por espermina em camundongos.
- 4 - Investigar a interação das poliaminas com o receptor TRPV1.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Dor

A dor é um fenômeno mundial e aparece entre as causas pelas quais pacientes procuram serviços de saúde. Estudos mostram que mesmo com intervenção terapêutica, 40% dos pacientes no pós-operatório, relatam inadequado alívio da dor, ou que permanecem com dor moderada ou forte, mesmo após o uso de analgésico. Outro estudo constatou que metade dos pacientes em estado terminal apresentaram dor moderada a grave durante os últimos dias de vida (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007). Dentre os fatores relacionados com a deficiência no controle da dor incluem-se razões culturais, políticas, sociais, bem como a pouca compreensão para os mecanismos envolvidos na produção da dor (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007; HUNT; MANTYH, 2001; JULLIUS; BASBAUM, 2001).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão (LOESER; TREEDE, 2008). Essa manifestação dolorosa do organismo apresenta dois objetivos. O primeiro propósito da dor é avisar um possível dano ou ameaça iminente de dano corporal, como, por exemplo, quando se entra em contato com objetos quentes. O segundo objetivo da dor é incentivar comportamentos de recuperação tecidual em resposta à dor, quando o local no mesmo já foi danificado, seja através de inflamação ou infecção (WATKINS; MAIER, 2002). A estimulação dos terminais sensoriais periféricos pode gerar reações exacerbadas e provocar dor em resposta a estímulos não nociceptivos (alodínia) ou promover sensação dolorosa aumentada (hiperalgesia) (LOESER; TREEDE, 2008). Além da alodínia e da hiperalgesia, os nociceptores periféricos podem dar início a potenciais de ação sem qualquer estímulo externo, causando dor "espontânea". Os três tipos de manifestação dolorosa podem se desenvolver em condições patológicas, como inflamações ou lesões do nervo (LINLEY *et al.*, 2010).

Pela definição do estado doloroso é possível observar que essa manifestação envolve um significativo componente psicológico que pode alterar sua percepção, dependendo das influências ambientais e pessoais de cada paciente. Já o chamado

componente sensorial da dor, conhecido como nocicepção, é um processo de codificação neural e processamento de estímulos nocivos e não nocivos (LOESER; TREEDE, 2008). A transmissão nociceptiva ocorre através de fibras sensoriais, formadas por neurônios, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigeminal (TG), e conduzem informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinal e até o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente. Imediatamente, ocorre um reflexo de retirada e, simultaneamente, redistribuição das informações para centros cerebrais superiores onde se processará a dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; WATKINS; MAIER, 2002).

Todos os sistemas sensoriais devem converter sinais ambientais em eletroquímicos. No caso da nocicepção, neurônios primários sensoriais da via nociceptiva possuem uma habilidade para detectar uma ampla gama de modalidades de estímulos, incluindo aqueles de natureza física e química. Além disso, os nociceptores não apenas transmitem o sinal de dor aguda, mas também contribuem para condições de dor patológica persistente (JULLIUS; BASBAUM, 2001). Existem três tipos principais de fibras sensoriais no sistema nervoso periférico: fibras A β , A δ e fibras C. As fibras A β são de grande diâmetro e altamente mielinizadas, permitindo-lhes conduzir rapidamente potenciais de ação da periferia aos terminais centrais; essas fibras são responsáveis pelo transporte de estimulação tátil. As fibras sensoriais que conduzem o estímulo doloroso são de médio e pequeno diâmetro e são conhecidas como fibras A δ e C, respectivamente. As fibras do tipo A δ são levemente mielinizadas, conduzem o potencial de ação mais rapidamente que as fibras C e possuem um limiar de ativação maior que as fibras A β . Por outro lado, as fibras C são não-mielinizadas e apresentam o maior limiar de ativação. Tanto as fibras C quanto A δ podem responder a estímulos nocivos mecânico, químico e térmico (D'MELLO; DICKENSON, 2008).

A sensibilização periférica representa uma forma de plasticidade funcional do nociceptor o qual promove uma redução no limiar de ativação por um aumento na resposta a um determinado estímulo, ou o aparecimento de atividade espontânea. Esta sensibilização é resultado das ações dos sistemas de segundo mensageiro ativado pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como metabólitos do ácido aracdônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, serotonina e noradrenalina), peptídeos (cininas e taquicininas), proteínas (citocinas e fatores do crescimento), purinas (ATP, ADP e adenosina), prótons e

outros (BESSON, 1999). A ação de mediadores inflamatórios nos neurônios sensoriais é mediada por seus receptores específicos, que se dividem em três categorias gerais: os receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G), os receptores enzimáticos e os receptores ionotrópicos (canais permeáveis a íons). De maneira interessante, em qualquer dos três casos, os canais iônicos estão envolvidos na geração e na propagação do potencial de ação que gera um sinal nociceptivo (LINLEY *et al.*, 2010).

4.2 Poliaminas

As poliaminas são aminas catiônicas orgânicas, derivam de aminoácidos, encontram-se protonadas em pH fisiológico. Essas moléculas foram, primeiramente, identificadas como cristais em sêmem por Van Leewenheuk, em 1678, sendo, posteriormente, denominadas de esperminas. Aproximadamente 200 anos após, a putrescina foi descoberta em microorganismos; mais tarde ainda, no início do século 20, é que a espermidina foi indentificada (GERNER; MEYSKENS, 2004). A putrescina, a espermidina e a espermina são as poliaminas mais importantes encontradas nas células de mamíferos (SEILER; DELCROS; MOULINOX,1996). Essas três moléculas são compostas por uma, duas ou três cadeias de carbono alifáticas e flexíveis, são conectadas por átomos de nitrogênio e carregam grupamentos amino primários em cada ponta da cadeia. As características da estrutura química das poliaminas indicam que a putrescina é uma diamina (1,4-diaminobutano); a espermidina é uma triamina (mono-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano); a espermina é uma tetramina (bis-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (TETI; VISALLI; NAIR, 2002).

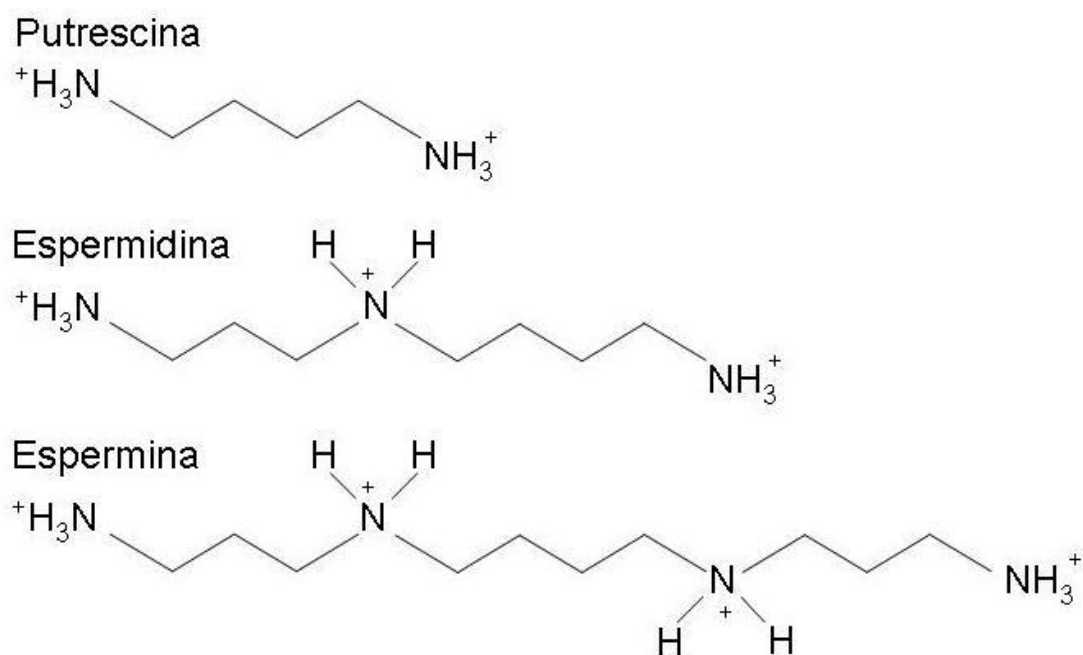


Figura 1. Estrutura das poliaminas: putrescina, espermidina e espermina (adaptado de TETI; VISALLI; NAIR, 2002).

Essas moléculas são obtidas através da síntese, da retroconversão, ou mesmo através do metabolismo de aminoácidos, pela flora intestinal. No processo de síntese, o principal precursor é a ornitina, que origina a putrescina através da enzima ornitina descarboxilase (ODC). A ornitina descarboxilase é a enzima passo-limitante da síntese das poliaminas. Após a formação da putrescina, esta é convertida para espermidina pela ação da enzima espermidina sintase que transfere grupamento aminopropil da molécula de S-adenosil-metionina descarboxilada (SAMDC). Um segundo grupamento aminopropil é adicionado à espermidina pela enzima espermina sintase, produzindo-se, nessa última etapa, a molécula espermina (TETI; VISALLI; NAIR, 2002). A obtenção das poliaminas ocorre, também, por meio da retroconversão, em que espermina pode ser convertida em espermidina e esta, por sua vez, em putrescina. Essas reações ocorrem pela acetilação da espermina e da espermidina na posição N1 pela ação da enzima N1-acetiltransferase (SSAT). Em seguida, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, liberando os grupos aminopropil provenientes da SAMDC por ação da enzima poliamina oxidase (PAO) (SEILER, 1994) para produzir putrescina, espermidina e

N1-acetilespemidina. A terceira forma de obter poliaminas é através das bactérias do trato gastrointestinal e da dieta. Dentre os alimentos com alto teor de poliaminas incluem-se a carne vermelha e o queijo, mas elas também estão presentes em frutas, verduras e alimentos fermentados. Tanto as poliaminas sintetizadas por bactérias quanto as provenientes da dieta são parcialmente absorvidas pelo trato gastrointestinal e podem, subsequentemente, ser transportadas para o interior das células por meio de carreadores (TETI; VISALLI; NAIR, 2002).

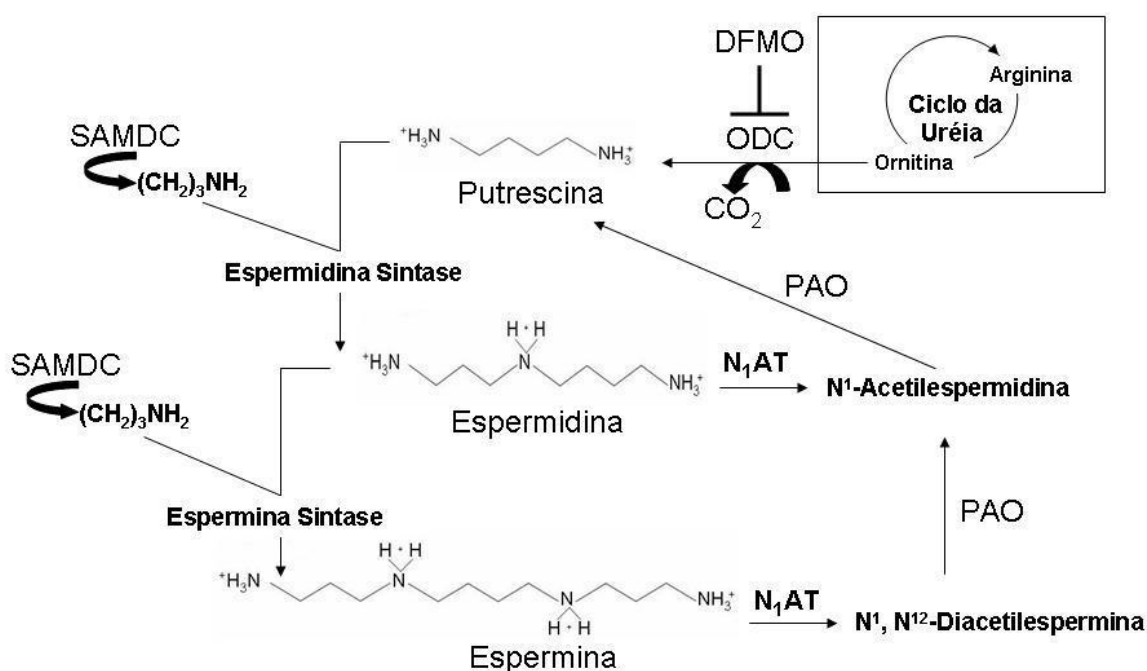


Figura 2. Síntese das poliaminas. DFMO (α -diflorometilornitina), ODC (ornitina descarboxilase), PAO (poliamina oxidase), N₁AT (N₁ acetiltransferase) e SAMDC (S-adenosil-metionina descarboxilada) (adaptado de Gerner e Meyskens, 2004).

Como visto anteriormente, o processo de síntese das poliaminas envolve inúmeras enzimas, entre elas a enzima passo-limitante neste processo, a ornitina descarboxilase. Esta enzima aparece bastante envolvida na proliferação celular de diversos tecidos; é uma proteína que possui meia-vida curta de 10 a 30 minutos em mamíferos (CASERO; MARTON, 2007). Assim, a busca por inibidores desta enzima começou com o objetivo de inibir o crescimento tumoral (SEILER, 2005). Então, em 1978, foi sintetizado o inibidor da ODC, por Metcalf e colaboradores, chamado de 2-difluormetilornitina (DFMO) (BACHRACH, 2010). Inicialmente, o DFMO compete

com a ornitina pelo sítio ativo da ODC; após, o DFMO é descarboxilado pela enzima e origina intermediários altamente reativos que inativam a enzima ODC de maneira irreversível. Este inibidor é amplamente estudado, e já foi descrito que a inibição da ODC produz diminuição quase completa de putrescina e espermidina em cultura de tecidos (CASERO; MARTON, 2007). Além disso, sabe-se que o DFMO suprime o desenvolvimento do câncer em modelos animais e também suprime a expressão de genes que estão envolvidos na proliferação de células, remodelação de tecidos e/ou invasão tumoral, pelo menos em modelos experimentais. Assim, pelo fato de as poliaminas estarem relacionadas com o processo cancerígeno, o DFMO, que é bem tolerado em humanos, está passando por rigorosos ensaios clínicos e parece ser um alvo interessante como um agente preventivo em vários tumores epiteliais, incluindo tumor de próstata e câncer de cólon (GERNER; MEYSKENS, 2004).

Interessantemente, Kergozien *et al.* (1996) relataram que durante uma pesquisa clínica, pacientes com câncer de próstata pararam espontaneamente com o uso de analgésicos opioides ao serem submetidos à dieta deficiente de poliaminas e, concomitantemente, utilizarem DFMO e antibióticos para diminuir a flora intestinal. Esse resultado não pode ser explicado puramente pelo efeito antitumoral do protocolo de restrição de poliaminas. Então, esse protocolo de privação de poliaminas foi avaliado em dois modelos de nocicepção em ratos saudáveis. A privação das poliaminas produziu um aumento na latência tanto nos testes nociceptivos térmico e mecânico (KERGOZIEN *et al.*, 1996). Outro estudo avaliou a restrição de poliaminas apenas na dieta em modelo nociceptivo mecânico induzido por carragenina. Observou-se, nesse segundo estudo, que a dieta deficiente em poliaminas mostrou um significativo efeito analgésico no teste de hiperalgesia mecânica induzido por carragenina em ratos (ESTEBE *et al.*, 2006). A literatura descreve, ainda, um estudo que, avaliando o efeito da dieta deficiente em poliaminas e parâmetros de nocicepção, demonstrou que essa dieta preveniu o aumento da fosforilação da tirosina da subunidade NR2B do receptor NMDA na medula espinhal, que está associada com a hiperalgesia inflamatória. No mesmo estudo, verificou-se que a dieta deficiente em poliaminas preveniu a hipersensibilidade dolorosa inflamatória e incisional de longa duração, especialmente em animais tratados com opioides. A mesma dieta também reduziu fortemente algumas formas de dor crônica tais como dor neuropática e dor de artrite, bem como restabeleceu a eficácia da morfina (RIVAT *et al.*, 2007).

Dentre as funções exercidas por poliaminas, é importante relatar que elas possuem a capacidade de regular a movimentação iônica pela interação com diferentes canais iônicos e assim controlar a excitabilidade neuronal (WILLIAMS, 1997). Os canais iônicos em destaque são: receptores glutamatérgicos (NMDA e AMPA/cainato), receptor ASIC e receptor TRPV1 (AHERN; WANG; MIYARES, 2006; BABINI *et al.*, 2002; WILLIAMS, 1997). Nesse sentido, é interessante salientar que todos esses canais participam no desenvolvimento e processamento da dor.

Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos tais como: NMDA, AMPA e cainato possuem sequência de resíduos semelhantes e suas subunidades contêm: três segmentos transmembrana (M1, M3 e M4) mais o domínio M2 que é formado por uma porção reentrante, de onde provêm o poro, o domínio amino-terminal extracelular, o domínio extracelular do ligante e o domínio intracelular carboxi-terminal (TRAYNELIS *et al.*, 2010). Por meio de experimentos de ligação específica foi demonstrada a existência de três diferentes sítios de ligação no receptor NMDA para poliaminas (JOHNSON, 1996). Em baixas concentrações essas moléculas produzem aumento da ligação de [³H] MK801 ao receptor; por outro lado, em concentrações altas produzem a redução do aumento. Esses resultados demonstram que as poliaminas apresentam um efeito bifásico nesse receptor (WILLIAMS; ROMANO; MOLINOFF, 1989). Evidências para a ação das poliaminas na produção de comportamento nociceptivo e envolvimento de receptores glutamatérgicos, como NMDA, AMPA e cainato, foram relatadas inicialmente na literatura. Esses receptores são estruturas quaternárias, e suas subunidades formam o poro do canal central, estão expressos em neurônios sensoriais periféricos e centrais e estão envolvidos na transmissão nociceptiva em estado fisiológicos e inflamatórios (CARLTON, 2001). Kolhekar, Meller e Gebhart (1994) demonstraram que a administração intratecal de espermina produz hiperalgesia em ratos, esse efeito foi avaliado no teste de retirada da cauda. Constatou-se que este efeito é mediado por receptor NMDA, pois seu antagonista MK801 diminuiu o comportamento de hiperalgesia. Em sintonia com esses resultados, Tan-No *et al.* (2000) mostraram que a administração intratecal de espermina produz resposta espontânea nociceptiva em camundongos. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que o comportamento espontâneo nociceptivo foi inibido pela administração intraperitoneal de morfina. Também ocorreu diminuição desta resposta quando antagonistas competitivos e o bloqueador MK801 do canal iônico

NMDA foram administrado intratecalmente. Porém, o antagonista do receptor não-NMDA não inibiu a nocicepção induzida por espermina administrada intratecalmente. Assim como a administração central de poliaminas produz efeito nociceptivo, a injeção periférica de agonistas específicos dos receptores NMDA, AMPA e cainato também produziu aumento significativo de retirada da pata de ratos após estímulos mecânicos nocivos e não-nocivos (hiperalgesia e alodínia) (ZHOU; BONASERA; CARLTON, 1996).

Além dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, Babini *et al.* (2002) demonstraram que as poliaminas podem agir em canal iônico sensível ao ácido ASIC-1. Esse canal apresenta estrutura contendo dois domínios transmembrana (TM₁ e TM₂), uma grande porção extracelular e as porções de carboxi e amino terminais que se encontram no espaço intracelular. Esse canal iônico é expresso em neurônios sensoriais, incluindo os de pequeno diâmetro sensíveis à capsaicina, e, também, em todo o cérebro. Eles respondem rapidamente à queda no pH, promovem o influxo de Na⁺, pois são seletivos a esse cátion e, conseqüentemente, ocorre a transmissão nociceptiva por neurônios sensoriais (WALDMANN *et al.*, 1997). Por isso acredita-se que esse receptor esteja envolvido na excitação de neurônios em tecidos que estão ácidos, nos processos inflamatórios ou na esquiemia, por exemplo. Os resultados de Babini *et al.* (2002) indicam que cátions polivalentes como espermina modulam o receptor ASIC1a e, por isso, a ação nociceptiva induzida por espermina pode ser mediada por esse canal.

Outro receptor iônico de papel importante na nocicepção é o receptor TRPV1, pertencente à família dos TRP que se constitui de canais catiônicos não seletivos. Os receptores TRPV1 são formados por seis domínios transmembrana contendo porções amino e carboxi terminais localizados intracelularmente, e a região do poro encontra-se entre os domínios 5 e 6 (LATORRE *et al.*, 2007). Existem algumas substâncias naturais capazes de ativar esse canal, tais como, a capsaicina, o pungente ingrediente de pimenta vermelha, e seu análogo ultrapotente, a resiniferatoxina, presente na espécie *Euphorbia resinifera*. Inicialmente, após a aplicação dos agonistas do receptor TRPV1, ocorre uma resposta dolorosa, com aumento da sensibilidade a estímulo mecânico, mas principalmente a estímulo térmico (CALIXTO *et al.*, 2005) Porém, tanto a capsaicina quanto a resiniferatoxina promovem a dessensibilização e a degeneração de fibras sensoriais TRPV1 positivas, tornando esses neurônios não responsivos a estímulos químicos,

mecânicos e térmicos (CATERINA; JULIUS, 2001). Além dos ligantes naturais, já se conhecem alguns ligantes endógenos do receptor TRPV1, entre eles os metabólitos do ácido araquidônico e o mediador lipídico anandamida (CALIXTO *et al.*, 2005). Esse canal iônico também é ativado por temperaturas altas (> 42 °C). O receptor TRPV1 é o canal mais expresso em neurônios aferentes primários; é também regulado por prótons e por cátions extracelulares, incluindo Na⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺. Além disso, Ahern *et al.* (2007) demonstraram que concentrações fisiológicas de cátions regulam o receptor TRPV1 após lesão tecidual e inflamação. É importante destacar que experimentos realizados pelo mesmo grupo, utilizando bradicinina e calor, sugerem que concentrações fisiológicas de cátions divalentes aumentam a atividade de TRPV1 durante sinalização da dor inflamatória. Interessantemente, Ahern, Wang e Miyares (2006) demonstraram, por meio de experimentos eletrofisiológicos, que o canal iônico TRPV1 também pode ser modulado por poliaminas. Nesse estudo foi demonstrado que a espermina, a espermidina e a putrescina podem ativar TRPV1 de maneira dependente da carga, tanto em sistemas como células HEK 293 como em neurônios sensoriais em cultura. Então, no trabalho mencionado, Ahern, Wang e Miyares (2006) propõem que as poliaminas poderiam representar uma nova classe de ligantes endógenos do receptor TRPV1.

Os resultados encontrados em um estudo realizado em pacientes com artrite reumatoide sugerem que as poliaminas desempenham um papel importante em cujos tecido e líquido sinovial foram encontrados níveis aumentados de poliaminas. Além disso, os mesmos autores mostraram uma significativa correlação positiva entre os níveis de proteína C reativa (um marcador de atividade inflamatória) e putrescina em tecido sinovial, sugerindo que as poliaminas poderiam estar mediando o processo inflamatório. Esse resultado sugere que as poliaminas presentes em tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide podem estar relacionadas com a rápida proliferação do tecido sinovial nesses pacientes (YUKIOKA *et al.*, 1992). Da mesma maneira, FURUMITSU *et al.* (1993) confirmaram estudos prévios sobre o aumento de putrescina em fluido sinovial através da medida de poliaminas em amostra de urina, bem como a correlação positiva entre a proteína C reativa e níveis de putrescina também analisado na urina de pacientes com artrite reumatoide. Nesse sentido, outro estudo realizado com leucócitos sinoviais mostrou aumento dos níveis de putrescina nessas células obtidas de pacientes com artrite reumatoide como resultado da elevação da atividade da enzima N₁AT induzida por interleucina 1

beta (FURUMITSU *et al.*, 2000). Ressalte-se, ainda, que foram encontrados níveis aumentados de poliaminas em modelo experimental de dor inflamatória causada por carragenina em ratos (CHAKRADHAR; NAIK, 2007). Esses dados demonstram o envolvimento das poliaminas em quadros inflamatórios, porém a relação dessas moléculas com a dor inflamatória especificamente em sítios periféricos não está bem descrita.

Assim, apesar de alguns estudos demonstrarem que as poliaminas ativam canais iônicos e que estes possuem importante papel na produção e transmissão da dor, a ação periférica e a real ativação desses canais pelas poliaminas no desenvolvimento da dor aguda *in vivo* ainda não estão bem descritas. Tendo em vista esses dados, a regulação dos níveis de poliaminas poderia ser um mecanismo importante no controle e tratamento da dor, principalmente naquela associada com processos inflamatórios.

5 RESULTADOS

**CONTRIBUTION OF VANILLOID RECEPTOR TO THE NOCICEPTION INDUCED
BY PERIPHERAL INJECTION OF SPERMINE IN MICE**

Camila Gewehr^a, Mariane Arnoldi da Silva^b, Gabriela Trevisan dos Santos^b, Mateus Fortes Rossato^b, Carine Cristiane Drewes^c, Andréia Martini Pazini^b, Gustavo Petri Guerra^b, Maribel A. Rubin^{a,b,c}, Juliano Ferreira^{a,b,c,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, ^cDepartment of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Author for Correspondence: Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil; FAX (5555) 3220-8978, Tel (5555) 32208053. E-mail: ferreiraj99@gmail.com

Running title: Peripheral polyamines in nociception

Abstract: Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are important endogenous regulators of ion channels, such as vanilloid (TRPV1), glutamatergic (NMDA or AMPA/kainate) and acid-sensitive (ASIC) receptors. In the present study, we have investigated the possible nociceptive effect induced by polyamines and the mechanisms involved in this nociception. The subcutaneous (s.c.) injection of capsaicin, spermine, spermidine or putrescine produced nociception with ED₅₀ of 0.16 (0.07-0.39) nmol/paw, 0.4 (0.2-0.7) μmol/paw, 0.3 (0.1-0.9) μmol/paw and 3.2 (0.9-11.5) μmol/paw, respectively. The antagonists of NMDA (MK801, 1 nmol/paw), AMPA/kainate (DNQX, 1 nmol/paw) or ASIC receptors (amiloride, 100 nmol/paw) failed to reduce the spermine-triggered nociception. However, the TRPV1 antagonists capsazepine or SB366791 (1 nmol/paw) reduced spermine-induced nociception, with inhibition of 81±10 and 68±9%, respectively. The previous desensitization with resiniferatoxin (RTX) largely reduced the spermine-induced nociception and TRPV1 expression in the sciatic nerve, with reductions of 82±9% and 67±11%, respectively. Furthermore, the combination of spermine (100 nmol/paw) and RTX (0.005 fmol/paw), in doses which alone were not capable of inducing nociception, produced nociceptive behaviors. Moreover, different concentrations of spermine (3-300 μM) enhanced the specific binding of [³H]-RTX to TRPV1 receptor. Altogether, polyamines produce spontaneous nociceptive effect through the stimulation of TRPV1, but not of ionotropic glutamate or ASIC receptors.

Perspective: This article shows that polyamines could be important peripheral modulators of pain, especially during inflammatory processes when local polyamine levels are increased.

Keywords: polyamines; analgesic; ion channels; pain; capsaicin

Introduction

Polyamines putrescine (1,4-butane diamine), spermidine (N-(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine) and spermine (N,N0-bis(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine) are aliphatic amines initially formed by decarboxylation of ornithine, a reaction catalysed by the enzyme ornithine decarboxylase.³¹ Known functions of polyamines include interactions with several biomolecules, specially ion channels.^{8,26,34,35}

In fact, various functions of the central nervous system (CNS) are related with polyamine actions on ion channels.³⁰ Several *in vitro* and *in vivo* evidences have demonstrated that polyamines can modulate N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) or kainite receptors in CNS.^{30,35} It is also already known that polyvalent cations, such as spermine, are modulators of ASIC receptor activity.³ Interestingly, an *in vitro* study has demonstrated that intracellular and extracellular polyamines can modulate the vanilloid receptor TRPV1 activity, a member of the transient receptor potencial (TRP) channel family.² These findings suggest that polyamine could also regulate the function of ion channels in other tissues.

TRPV1, ASIC and glutamatergic NMDA or kainate receptors are expressed by a subset of peripheral pain-sensing neurons.^{5,6,24} When such receptors are exposed to tissue damaging stimuli, these channels become permeable to Na⁺ and Ca²⁺ ions, causing, in turn, neuronal depolarization and recognition as pain stimulus. Sensory neuron firing transmits these pain signals towards the central nervous system, evoking at the same time a variety of local tissue responses.⁷ The peripheral administration of vanilloid, ASIC or glutamate receptor agonists results in nociceptive behavior in mice and rats.^{4,12,21,28,37} On the other hand, peripheral administration of TRPV1, ASIC or NMDA antagonists can attenuate nociception in models of

inflammatory pain.^{10,21,29} Of note, the levels of polyamines are increased in tissue and synovial fluid of patients with arthritis,³⁶ suggesting polyamines could mediate inflammatory pain.

Therefore, the present study aimed to assess the role of peripheral polyamines in nociception *in vivo* and investigate the role of glutamatergic NMDA and AMPA/kainite as well as ASIC and TRPV1 receptors in this action.

Methods

Animals

Male Swiss mice (30–35 g) maintained at 22±2°C with free access to water and food, under a 12:12 h light: dark cycle, were used. Animals were acclimatized in the laboratory for at least 2 h before testing and were used once throughout the experiments. All experiments were conducted in accordance to the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain,³⁹ the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). The number of animals and the nociceptive stimulus were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. This study was approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our university (no. 23081.012331/2009-81).

Allogene-induced nociceptive responses

The procedure used was similar to that previously described by Ferreira et al and Oliveira et al.^{12,22} A volume of 20 µl of capsaicin (0.01–3 nmol/paw), glutamate (10000 nmol/paw), putrescine (1000-10000 nmol/paw), spermidine (100-2000 nmol/paw) or spermine (100–2000 nmol/paw) was injected subcutaneously (s.c.)

under the surface of the right hind paw. Separate groups of animals received s.c. injection of the appropriated vehicle phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 27 mM KCl and 10 mM phosphate buffer) or PBS plus ethanol 0.25% for capsaicin. Animals were placed individually in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm in diameter) and were adapted for 20 min before treatment. After challenge, mice were observed individually for 5 min and the amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. The dose and the time of administration of drugs were based on pilot studies.

Involvement of NMDA, AMPA/kainate, TRPV1, ASIC receptors in spermine-induced nociception

In order to assess the involvement of NMDA, AMPA/kainate or TRPV1 receptors in the nociceptive responses induced by spermine (1000 nmol/paw), animals were co-administered with the selective NMDA receptor antagonist MK 801 (1 nmol/paw), AMPA/kainate receptor antagonist DNQX (1 nmol/paw), acid-sensitive ion channel (ASIC) blocker amiloride (100 nmol/paw), TRPV1 receptor antagonist capsazepine (0.1–1 nmol/paw), the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (1 nmol/paw) or the TRPV1 agonist resiniferatoxin (RTX; 0.005 pmol/paw). The choice of the dose of antagonists was based on previous data described in literature.^{4,12,13,21,22} Control animals received a similar volume of vehicle (20 µl/paw). To confirm the efficacy of the antagonist tested, we tested the effect of MK801 (1 nmol/paw) and DNQX (1 nmol/paw) co-administration with glutamate (10000 nmol/paw), as well as capsazepine (1 nmol/paw) and SB366791 (1 nmol/paw) co-administration with capsaicin (1 nmol/paw).

Desensitization of TRPV1 positive fibers in spermine-induced nociception

To further explore the role of TRPV1 positive (TRPV1+) fibers in the nociceptive induced by spermine, the animals were submitted to a systemic desensitization protocol with RTX as previously described by Hsieh et al.¹⁵ Animals were anesthetized with isoflurane and received systemic administration of RTX (50 µg/Kg) or the vehicle alone (0.5% ethanol, 0.5% Tween-80, PBS). After 7 days, animals were submitted to a subcutaneous injection of spermine (1000 nmol/paw, s.c.), capsaicin (1 nmol/paw, used as a positive control) or vehicle (0.5 % ethanol, 0.5% Tween-80 and PBS) (20 µl/paw).

TRPV1 receptor expression following systemic RTX treatment

The effect of the systemic treatment with RTX on the expression of TRPV1 receptors was assessed by Western blot analysis. The assay was carried out as previously described by Andre et al with minor modifications.¹ The sciatic nerves were quickly isolated and were homogenized in a lyses buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 M KCl, 2 M MgCl₂, 0.1 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 M NaF, 10 µg/mL aprotinin, 10 M β-glycerolphosphate, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 M DL-dithiothreitol (DTT) and 2 M of sodium orthovanadate. After centrifugation (3000 xg for 30 mim), the supernatant was collected. The protein content was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard. Amounts of 30 µg of protein of sciatic nerve were mixed in load buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 10 min. Proteins were separated in 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gels (SDS–PAGE) and

transferred to polyvinylidene difluoride membranes, according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, USA). The Ponceau staining served as a loading control. After staining the membranes were dried, scanned and quantified. Membranes were processed using a SNAP i.d. system (Millipore, USA), blocked with 1% BSA in TBS-T (0.05% Tween 20 in Tris-borate saline) and then incubated for 10 min, with specific antibodies to anti-TRPV1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:150 in TBS-T. Blots were washed three times with TBS-T followed by incubation with alkaline phosphatase-coupled secondary antibody (1:3000) for 10 min. The protein bands were visualized with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium system (BCIP/NBT). Membranes were dried, scanned and quantified with Scion Image PC version of Macintosh compatible NIH image. The TRPV1 western blot had a faint background that was corrected in the image analysis.

[³H]-RTX Binding Assay

Binding assays were carried out as previously described by Andre et al, with minor modifications.¹ To obtain membranes for the binding studies, spinal cords (a rich source of vanilloid receptors) of mice were removed and disrupted with the aid of a tissue homogenizer in ice-cold buffer A, pH 7.4, which contained 5 mM KCl, 5.8 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.75 mM CaCl₂, 12 mM glucose, 137 mM sucrose, and 10 mM HEPES. The homogenate was firstly centrifuged for 10 min at 1000 xg in 4°C. The low-speed pellets were discarded, and the supernatants were further centrifuged for 30 min at 35,000 xg in 4°C. The resulting high-speed pellets, re-suspended in buffer A, were stored at -70°C until assayed. Binding assays were carried out in duplicate with a final volume of 500 µl, containing buffer A supplemented with 0.25

mg/ml bovine serum albumin, membrane (100 µg/protein) and 50 pM [³H]-RTX in absence or presence of spermine (3 - 300 µM). For the measurement of non-specific binding, 100 nM non-radioactive RTX was included in some tubes. Assay mixtures were set up on ice, and the binding reaction was then initiated by transferring the assay tubes to a 37°C water bath. After a 60-minute incubation period, cooling the mixtures on ice terminated the binding reaction, and then 50 µL of bovine α1-acid glycoprotein (2 mg/mL) was added to each tube (to allow the detection of specific binding). Finally, the bound and free membranes of [³H]-RTX were separated by centrifuging for 15 min at 20,000 xg in 4°C. The pellet was quantified using scintillation counting. Specific binding was calculated as the difference between the total and non-specific binding.

Drugs

The following drugs were used: spermine, spermidine, putrescine, MK801 (5S,10R-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate), DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione), glutamate, resiniferatoxin, capsazepine and capsaicin, SB366791 (N-(3-methoxyphenyl)-4-chlorocinnamide) (all from Sigma Chemical Company, St Louis, MO, U.S.A.). The stock solutions of the drugs were prepared in 1 mM phosphate-buffered solution (PBS) from Sigma (USA) pH 7.4 in siliconized plastic tubes, maintained at -20 °C and diluted to the desired concentration just before use. Capsaicin, capsazepine, SB366791 and resiniferatoxin stock solutions were prepared in absolute ethanol (90%) plus tween 80 (10%). For drug administration, the final concentration of ethanol and tween 80 did not exceed 0.5% and did not cause any detectable effect *per se* (results not shown). In addition, radio-labeled [³H]-resiniferatoxin was purchased from Perkin Elmer (USA).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm s.e.m., except ED₅₀ or ID₅₀ values (i.e., the dose of agonist necessary to produce 50% of the nociceptive response relative to the maximum effect, or the dose of antagonists necessary to reduce the agonist response by 50% relative to the control value, respectively), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. ED₅₀ and ID₅₀ values were calculated, using non-linear regression (sigmoidal dose-response curve, variable slope) with the GraphPad Prism software. E_{max} (maximal effect) and I_{max} (maximal inhibition) were calculated based on responses of the control group. The statistical significance between the groups was assessed by means of unpaired Student's t-test or one-way ANOVA followed by Dunnett's or Student-Newmann-Keuls' (SNK) test. P-values lower than 0.05 were considered as indicative of significance.

Results

Nociception elicited by peripheral polyamines in mice

The subcutaneously administration of capsaicin (0.01-3 nmol/paw), spermine spermidine or putrescine (100-10000 nmol/paw) in mice produced short-lasting and spontaneous nociception (Figure 1). This response started just after the administration and did not last more than 5 min. The calculated mean ED₅₀ values (and the 95% confidence limits) for capsaicin, spermine, spermidine or putrescine-induced licking were 0.16 (0.07-0.39) nmol/paw, 0.4 (0.2-0.7) μ mol/paw, 0.3 (0.1-0.9) μ mol/paw and 3.2 (0.9-11.5) μ mol/paw, respectively. The maximal nociceptive response caused by capsaicin, spermine, spermidine and putrescine were 51 \pm 4,

70±10, 47±14 and 37±11 s, respectively. Since spermine and spermidine were more potent than putrescine in producing nociception, we have chosen a sub-maximal dose of spermine (1000 nmol/paw) to study some mechanisms involved in polyamine-induced nociception.

Lack of participation of NMDA, AMPA/Kainate and ASIC receptors in the spermine-induced nociception

The selective NMDA receptor antagonist MK-801 (1 nmol/paw) was not capable of altering spermine-induced nociception (1000 nmol/paw, Figure 2A). On the other hand, the co-administration of MK-801 (1 nmol/paw) partially, but significantly, reduced the nociception caused by glutamate (10000 nmol/paw, Figure 2B) with inhibition of 47±12% compared with the control group. The co-administration of the selective antagonist AMPA/kainate receptor DNQX was also not capable of altering spermine-induced nociception (1000 nmol/paw, Figure 2C), but partially reduced the nociception caused by glutamate (10000 nmol/paw, Figure 2D), with inhibition of 55±6% compared with the control group. Furthermore, we verified that the co-administration of amiloride (100 nmol/paw), an ASIC receptor blocker, was also not able to modify the nociception induced by spermine (1000 nmol/paw; Figure 3). These results suggest that ionotropic glutamate and ASIC receptors activation did not mediate spermine-induced nociceptive effect.

Involvement of TRPV1 receptor in the spermine-induced nociception

We have further assessed the possible role of TRPV1 in spermine-induced nociception. The co-administration of the TRPV1 antagonist capsazepine (0.1–1 nmol/paw; s.c.) produced a dose-related and almost complete inhibition of spermine-induced nociception (1000 nmol/paw, Figure 4A). The calculated mean ID₅₀ value for this effect (and its respective 95% confidence limit) was 0.24 (0.03-1.76) nmol/paw and the maximal inhibition was 81±10% compared with the control group. As previously described in literature,^{12,29} the co-administration of capsazepine (1 nmol/paw; s.c.) also largely reduced the capsaicin-induced nociception (1 nmol/paw, Figure 4B), with inhibition of 80±6% compared with the control group. To confirm the hypothesis that the spermine-induced nociception is mediated by TRPV1 receptor, the mice received a co-administration of selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 (0.3-10 nmol/paw) with spermine. SB366791 also reduced spermine-induced nociception (Figure 4C), with inhibition of 68±9% compared with the control group and the ID₅₀ was 0.6 (0.3-1.4) nmol/paw. Similarly, the co-administration of SB366791 (1 nmol/paw) reduced the capsaicin-nociception (Figure 4D), with an inhibition of 72±8% compared with the control group. These data suggest that the activation of TRPV1 receptor is an important mechanism underlying the nociception induced by peripheral injection of spermine in mice.

Participation of TRPV1 positive fibers in the spermine-induced nociception

To investigate the role of TRPV1 expressing afferent fibers on spermine-induced nociception, animals were submitted to a systemic RTX desensitization protocol. The systemic treatment with RTX significantly reduced the expression of TRPV1 protein in the sciatic nerve 7 days after injection, with an inhibition of 67±11%

compared to the control group, confirming a reduction in TRPV1 positive sensory fibers (Figure 5A). We observed that pre-treatment with RTX (50 µg/Kg, s.c., 7 days before) largely reduced the capsaicin (1 nmol/paw) or spermine (1000 nmol/paw)-induced nociception (Figure 5B), with inhibitions of 92±4 and 82±9% compared with the control group, respectively.

Effect of spermine in resiniferatoxin binding and nociception

To clearly verify the interaction between polyamines with TRPV1 receptor, we performed a specific binding assay of RTX in presence or absence of spermine. It was possible to observe that spermine increases the [³H]-RTX specific binding in the TRPV1 containing membranes, with an IC₅₀ value of 54.0 (43.1 - 67.7) µM and the maximal effect of 76±5% of specific binding enhancement when compared to the control group (Figure 6A). Again, suggesting that polyamine-induced nociception is mediated by an interaction with TRPV1 receptor, we verified that the co-administration of spermine with RTX, in doses where they alone produced no nociceptive effect, resulted in a significant nociception (Figure 6B). These results strongly reinforce the idea that polyamines induce nociception by facilitating the activation of TRPV1 receptor.

Discussion

Natural polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are aliphatic amines containing two (putrescine), three (spermidine) or four (spermine) amine groups.¹⁴ It is well known that they have an important function in the control of the neuronal excitability through direct interaction with different ion channels, including glutamate receptors NMDA and AMPA/kainate, ASIC and TRPV1.^{2,3,35} All these ionic channels are important to the development and processing of nociception. Since the levels of polyamines are increased in inflammatory processes³⁶ and some drugs acting on polyamines are in clinical trials to treat hyperproliferative disorders,^{14,27} the present study could indicate new targets to treat painful conditions. In our study, we have shown that polyamines induced nociception when injected into the mouse paw by stimulation of the TRPV1 receptor present in small diameter afferent fibers. However, the stimulation of NMDA, AMPA/kainite or ASIC receptors seems to be not important to spermine-induced spontaneous nociception.

We have found that exogenous spermine and spermidine, which are the most charged polyamines, were more potent than putrescine in producing nociception. Our results are in accordance with some data demonstrating that some actions of polyamines in ion channels are charge-dependent.^{2,35} The pro-nociceptive action of polyamines found here are also in line with previous findings that show that the feeding of rats with a polyamine-deficient diet may produce analgesic action.^{11,17,27} Thus, both the restriction of polyamine ingestion and the inhibition of polyamine synthesis could be interesting targets to control painful processes.

It is well known the modulation of ion channels, including ionotropic glutamate receptors, by polyamines.³⁵ In fact, spermine acts at extracellular sites and at pore in neurons to potentiate the activity of NMDA, AMPA and kainate receptors, respectively. It has been hypothesized that these effects of spermine involve at least

two discrete polyamine-binding sites on NMDA receptors.³⁵ In accordance with these data, it has been demonstrated that intrathecal (spinal cord) administration of spermine causes hyperalgesia in rats and pain-related behaviors in mice by modulation of the NMDA receptor.^{19,32} These results indicate that polyamines in spinal cord can induce nociception through NMDA receptor-stimulation. Furthermore, peripheral administration of NMDA, AMPA/kainite results in painful behavior in rats.³⁷ In contrast with these data, our results demonstrated that the peripheral injection of NMDA receptor antagonist MK 801, in a dose where it is capable of reducing glutamate-induced nociception, failed in altering intraplantar spermine-induced nociception. Thus, we suggest that the peripheral mechanisms involved in spermine-induced nociception are different from the spinal mechanisms. However, the reduction of polyamine-induced nociception by the NMDA antagonists in spinal cord could be indirect since the activation of TRPV1 in spinal cord may release of glutamate *in vitro*³³ and produce an NMDA-mediated nociception *in vivo*.²³ However, further studies must be carried out to elucidate the role of spinal TRPV1 in the nociceptive action of intrathecally-injected polyamines.

Another ion channel that has been implicated in some polyamine action is the acid sensitive ion channel ASIC-1.³ We found that the non-selective ASIC receptor blocker amiloride was not able to reduce the spermine-produced nociception in mice in a dose where it reduced acid-induced nociception.²⁰ This result could be explain because the central nervous system seems to be the major place to the role of ASIC-1 on nociception.²⁰ Moreover, an *in vitro* study has showed that spermine shift the steady-state inactivation curve of ASIC-1 channel.³ Thus, the action of polyamines on ASIC-1 should produce antinociceptive effect instead of a pro-nociceptive action. Our

result indicates that the peripheral ASIC-1 receptor seems not to be a target related to polyamine-induced nociception.

Besides ionotropic glutamate and ASIC receptors, polyamines are also capable of directly stimulating TRPV1, producing ionic selectively changes in this receptor and resulting in Ca^{2+} influx in sensory neurons.^{2,9} Furthermore, extracellular spermine, spermidine and putrescine directly activate and sensitize TRPV1 in a charge-dependent manner, both in heterologous expression systems and in sensory neurons.² Here, we have shown that both capsazepine and SB366791 largely reduced spermine-induced nociception, demonstrating a critical role of TRPV1 in the pain-related behavior caused by peripheral polyamines.

Furthermore, it has been well established that the treatment of animals with agonists of TRPV1 receptor, such as RTX or capsaicin, is able to produce a selective degeneration of TRPV1 positive fibers, namely sub-types of primary afferent fibers, almost exclusively in peptidergic C fibers, but also in a small number of A δ fibers.^{12,15,18} Our data clearly show that the systemic treatment with RTX also significantly reduced the spermine-mediated nociception. This result provides evidence that spermine and RTX activate the same subpopulation of sensory fibers that express TRPV1 receptor and consequently produce nociceptive behavior. The reduction of the TRPV1 protein expression in sciatic nerve confirmed the efficiency of the RTX pre-treatment, which seems to reach to lumbar DRG²⁵ and consequently to reduce TRPV1 protein in sensory neuron terminals.

Experiments with TRPV1 mutants identified extracellular acidic residues critical for polyamine regulation since the neutralization of aspartate 646 (D646N) abolished direct activation by spermine, whereas neutralization of this same

aspartate (D646N) or glutamate 648 (E648A) inhibited spermine-induced sensitization.² According to this finding, we revealed herein that spermine increased the [³H]-RTX specific binding in the TRPV1 receptor containing membranes. We suggest that the RTX and polyamine binding sites are different once an increase instead of a competition for the specific binding was observed. In accordance to literature evidence, two residues located in the S2-S3 intracellular loop (Tyr-511, Ser-512) were found to be critical for RTX binding to TRPV1 channels.¹⁶ Our findings suggest that the polyamine binding on the site in TRPV1 receptor allosterically increases the affinity of the vanilloid site by its ligands. In fact, the combination of RTX with spermine, in doses where they did not produce nociception, resulted in a significant nociceptive response. Thus, polyamines found in inflamed tissue could increase the binding of endovanilloids in TRPV1 receptor and contribute to pain production.

Of note, increased levels of polyamines are found in tissue and synovial fluid from patients with osteoarthritis or rheumatoid, posttraumatic arthritis and infectious arthritis.³⁶ In accordance, spermine concentrations up to millimolar levels have been reported in inflammatory conditions.³⁸ Interestingly, the doses of polyamines used in our study to cause spontaneous nociception may be found in inflamed tissues, the concentration of the solution of spermine injected (0.5-150 mM to generate the doses of 0.01-3 μ mol/paw) into the mouse paw is in the same range of the spermine concentration in synovial tissue of arthritic patients (about 0.3 mM).³⁶ These findings suggest again that polyamine action on TRPV1 could contribute to pain production, especially in inflammatory conditions.

Taken together, these data show that polyamines, probably by virtue of their cationic charge, may increase the activity of TRPV1 in peripheral terminal of

neurons and induce nociception. Therefore, polyamine regulation of TRPV1 in peripheral tissues may be relevant to a variety of pathological painful states and represents a target for the treatment of such conditions.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Medicina Molecular (MCT/CNPq). We thank CNPq and CAPES for the fellowship support

References

1. Andre E, Ferreira J, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB: Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol in rats. *Neuropharmacology* 46:590-597, 2004
2. Ahern GP, Wang X, Miyares RL: Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem* 281:8991-8995, 2006
3. Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S: Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J Biol Chem* 277:41597-41603, 2002
4. Beirith A, Santos AR, Calixto JB: Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research* 924:219-228, 2002
5. Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J: Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 106:179-208, 2005
6. Carlton SM: Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol* 1:52-56, 2001
7. Caterina MJ, Julius D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience* 24:487-517, 2001
8. Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW: Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* 60:1394-1406, 2003

9. Chung MK, Güler AD, Caterina MJ: TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11:555-564, 2008
10. Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM: Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport* 8:941-946, 1997
11. Estebe JP, Legay F, Gentili M, Wodey E, Leduc C, Ecoffey C, Moulinoux JP: An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. *Anesth Analg* 102, 1781-1788, 2006
12. Ferreira J, da Silva GL, Calixto JB: Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 141, 787-94, 2004
13. Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 117, 171-181, 2005.
14. Gerner EW, Meyskens FL Jr: Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4, 781-792, 2004
15. Hsieh YL, Chiang H, Tseng TJ, Hsieh ST: Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-Methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 93-104, 2008
16. Jordt SE, Julius D: Molecular basis for species sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108:421-430, 2002

17. Kergozien S, Bansard JY, Delcros JG, Havouis R, Moulinoux JP: Polyamine deprivation provokes an antalgic effect. *Life Sci* 58:2209-2215, 1996
18. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K: Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493:596-606, 2005.
19. Kolhekar R, Meller ST, Gebhart GF: N-methyl-D-aspartate receptor-mediated changes in thermal nociception: allosteric modulation at glycine and polyamine recognition sites. *Neuroscience* 63:925-936, 1994
20. Mazzuca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N, Blondeau N, Escoubas P, Gélot A, Cupo A, Zimmer A, Zimmer AM, Eschalier A, Lazdunski M: A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10:943-945, 2007
21. Meotti FC, Coelho Idos S, Santos AR: The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *J Pain* 11:570-578, 2010
22. Oliveira SM, Gewehr C, Dalmolin GD, Cechinel CA, Wentz A, Lourega RV, Sehnem RC, Zanatta N, Martins MA, Rubin MA, Bonacorso HG, Ferreira J: Antinociceptive Effect of a Novel Tosylpyrazole Compound in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104:122-129, 2009
23. Okano K, Kuraishi Y, Satoh M: Involvement of substance P and excitatory amino acids in aversive behavior elicited by intrathecal capsaicin. *Neurosci Res* 19:125-130, 1994

24. Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R: An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport* 9:1109-1113, 1998

25. Rashid MH, Inoue M, Bakoshi S, Ueda H: Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 306:709-717, 2003

26. Rea G, Bocedi A, Cervelli M: Question: What is the biological function of the polyamines? *IUBMB Life* 56: 167-169, 2004

27. Rivat C, Richebé P, Laboureyras E, Laulin JP, Havouis R, Noble F, Moulinoux JP, Simonnet G: Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 137:125-137, 2007

28. Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K: The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31: 1279-1285, 1992

29. Santos AR, Calixto JB: Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett* 235:73-76, 1997

30. Scott RH, Sutton KG, Dolphin AC: Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci* 16:153-160, 1993

31. Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP: Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 28:843-861, 1996

32. Tan-No K, Taira A, Wako K, Nijima F, Nakagawasai O, Tadano T, Sakurada C, Sakurada T, Kisara K: Intrathecally administered spermine produces the scratching, biting and licking behaviour in mice. *Pain* 86:55-61, 2000
33. Ueda M, Kuraishi Y, Satoh M: Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system. *Neurosci Lett* 155:179-182, 1993
34. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A: A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376:1-14, 2003
35. Williams, K: Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325, 289-297, 1997
36. Yukioka K, Wakitani S, Yukioka M, Furumitsu Y, Shichikawa K, Ochi T, Goto H, Matsui-Yuasa I, Otani S, Nishizawa Y: Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 19:689-692, 1992
37. Zhou S, Bonasera L, Carlton SM: Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviours in rats. *Neuroreport* 7:895–900, 1996
38. Zhang M, Wang H, Tracey KJ: Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapin an old soty. *Crit Care Med* 28:60-66, 2000
39. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110, 1983

Figures

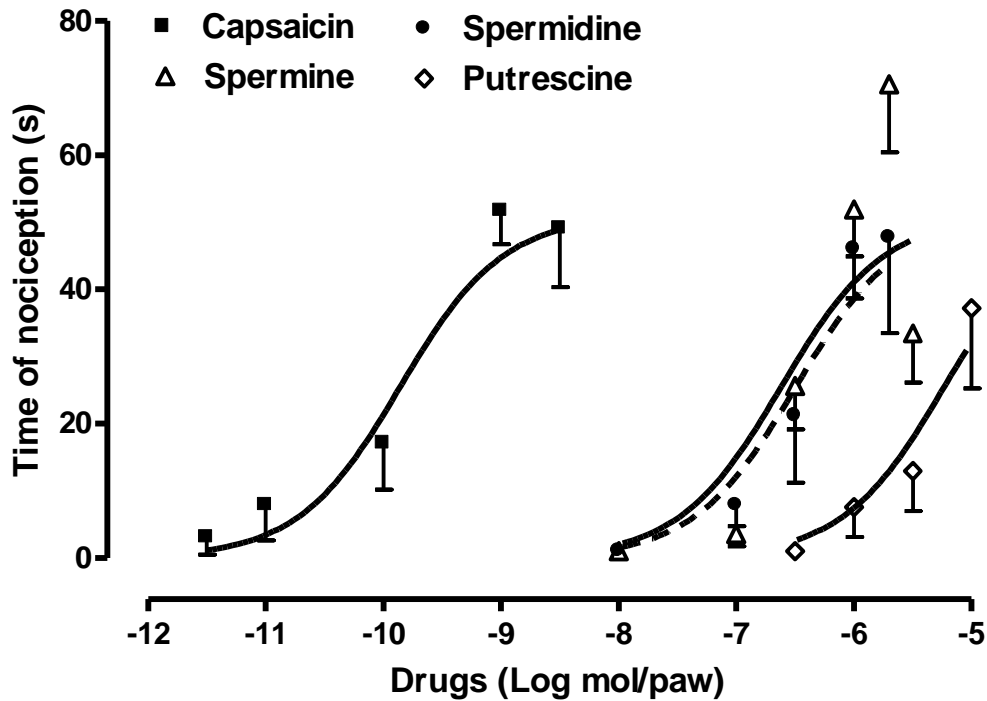


Figure 1. Dose–response curves for the overt nociception caused by s.c. injection of capsaicin (0.01-3 nmol/paw), spermine (100-2000 nmol/paw), spermidine (100-2000 nmol/paw) or putrescine (1000-10000 nmol/paw) in mice. The effects of the treatments are expressed as licking time (s). Each bar on the curve represents the mean of 6-10 animals and vertical lines show the S.E.M.

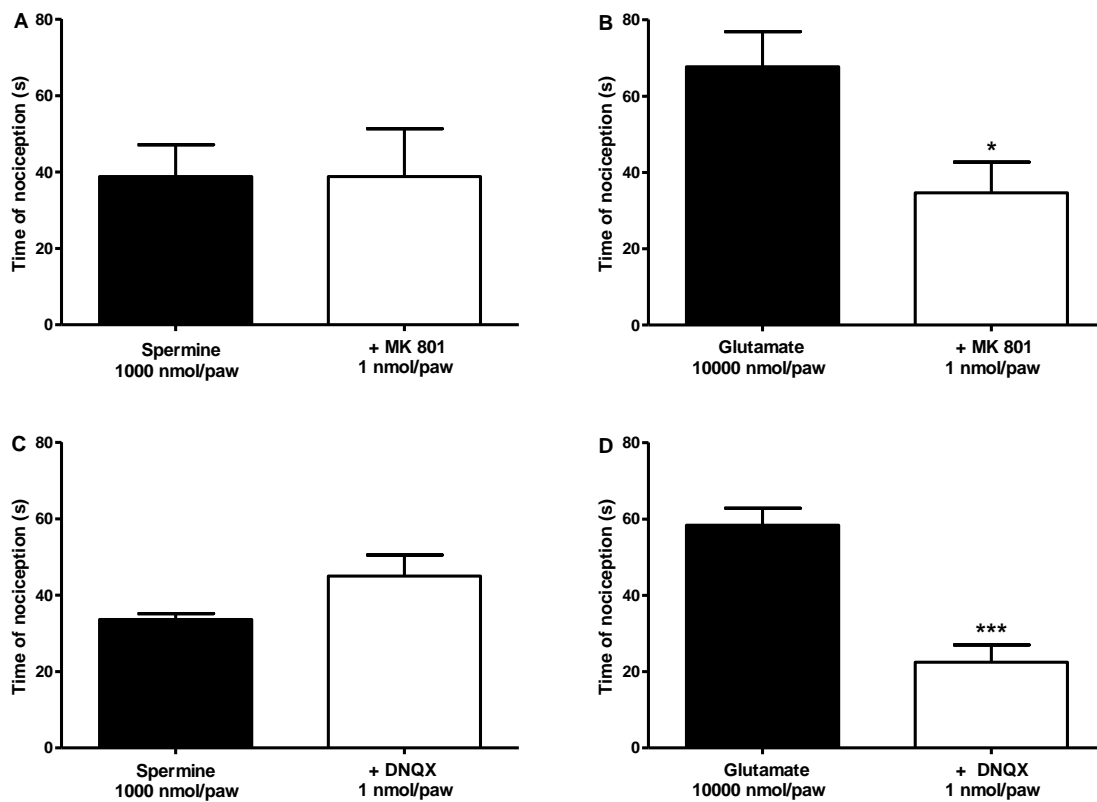


Figure 2. Effect of s.c. co-treatment with the selective NMDA receptor antagonist MK 801 (1 nmol/paw) or AMPA/kainate receptor antagonist DNQX (1 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, A e C) or glutamate-induced nociception (10000 nmol/paw, B e D). Each column represents the mean \pm s.e.m. of 5–6 mice. Asterisks denote the significance levels. *P<0.05, ***P<0.001 compared with glutamate-treated mice (Student's t test).

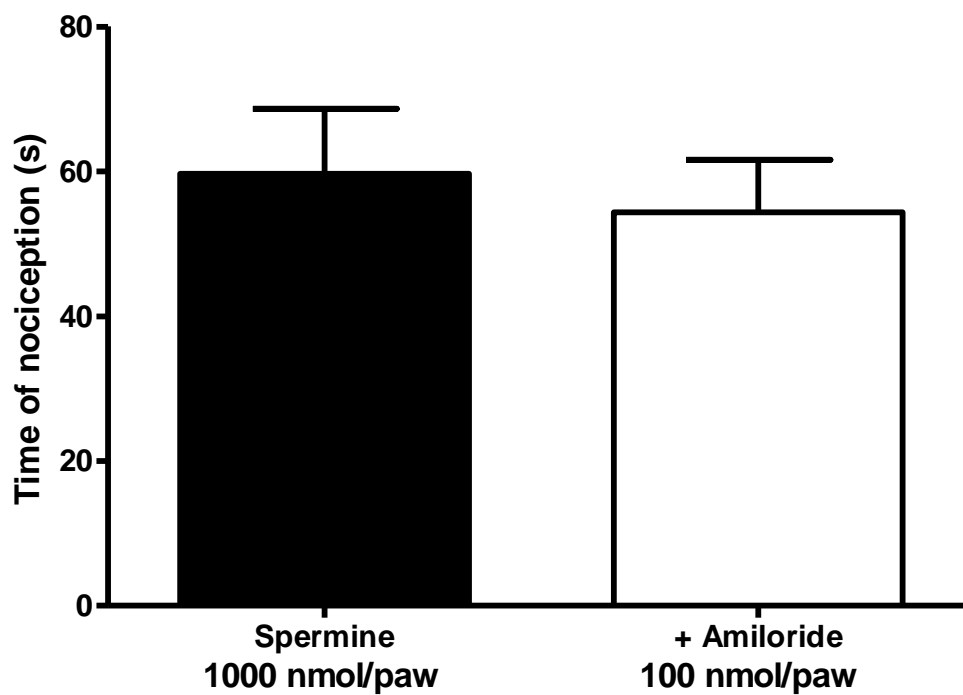


Figure 3. Effect of co-treatment with the acid-sensitive ion channel (ASIC) blocker amiloride (100 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, s.c.)-induced nociception in mice. Each column represents the mean \pm s.e.m of 6 mice.

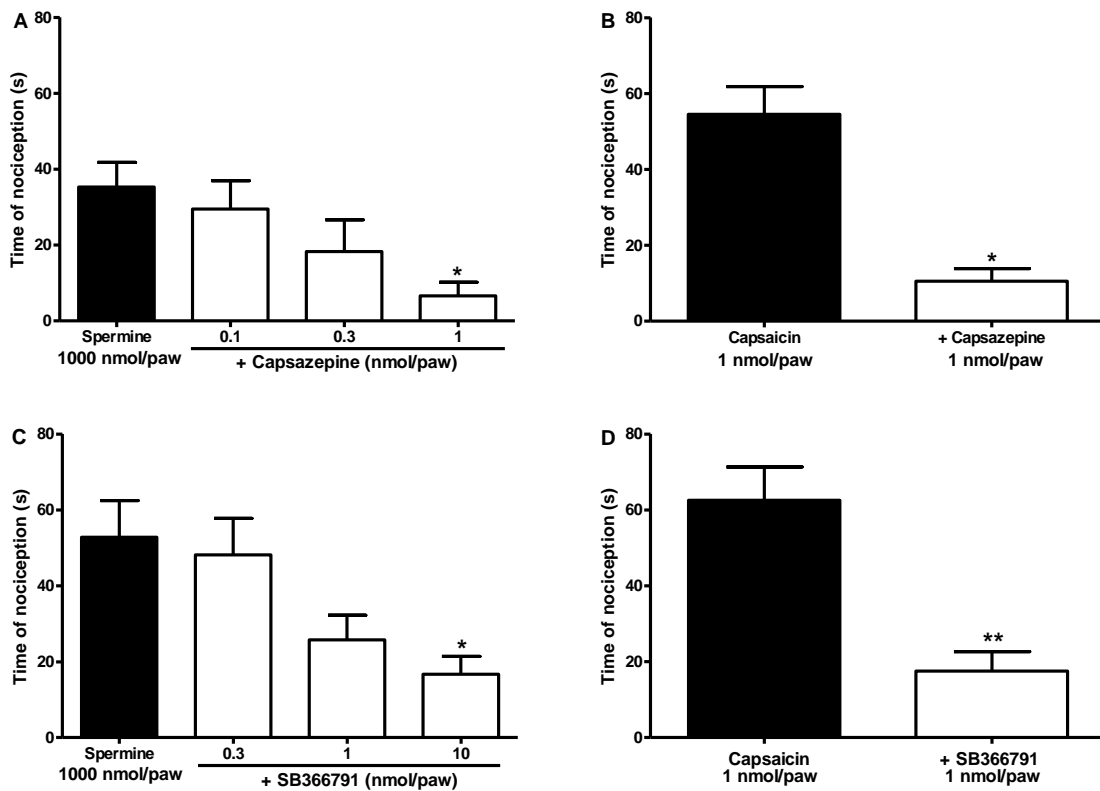


Figure 4. Effect of s.c. co-treatment with the TRPV1 receptor antagonists capsazepine (0.1-1 nmol/paw) or SB366791 (0.3-10 nmol/paw) on spermine (1000 nmol/paw, A e C) or capsaicin-induced nociception (1 nmol/paw, B e D). Each column represents the mean \pm s.e.m. of 4–8 mice. Asterisks denote the significance levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with spermine or capsaicin-treated mice (A and C, one-way ANOVA followed by Dunnett's test; B and D, Student's t test).

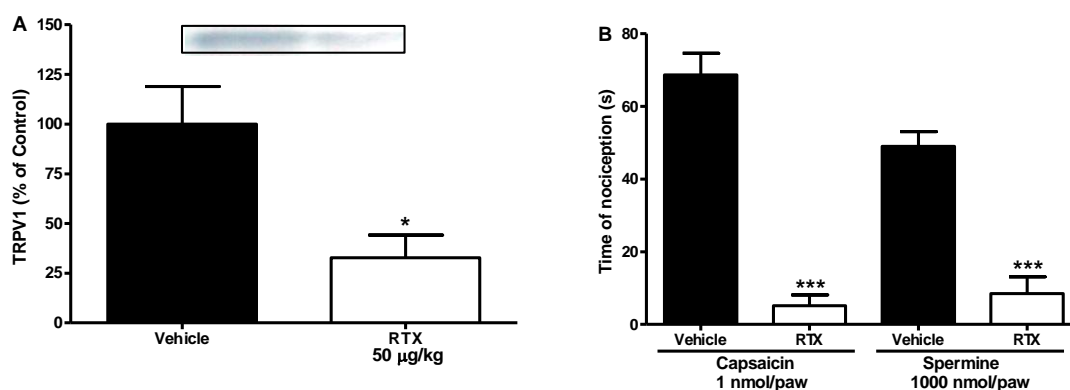


Figure 5. Western blot analysis showing TRPV1 expression in sciatic nerve (A) after systemic treatment with RTX (50 mg/kg, s.c.) or with vehicle. Effect of RTX desensitization (50 mg/kg, s.c.) on spermine (3 µg/paw, s.c.)-induced nociception in mice (B). Western blot results were represented as arbitrary density unit. Each column represents the mean±s.e.m of 4-8 mice. Asterisks denote the significance levels. *P<0.05, ***P<0.001 in comparison to control group (A and B, Student's t-test).

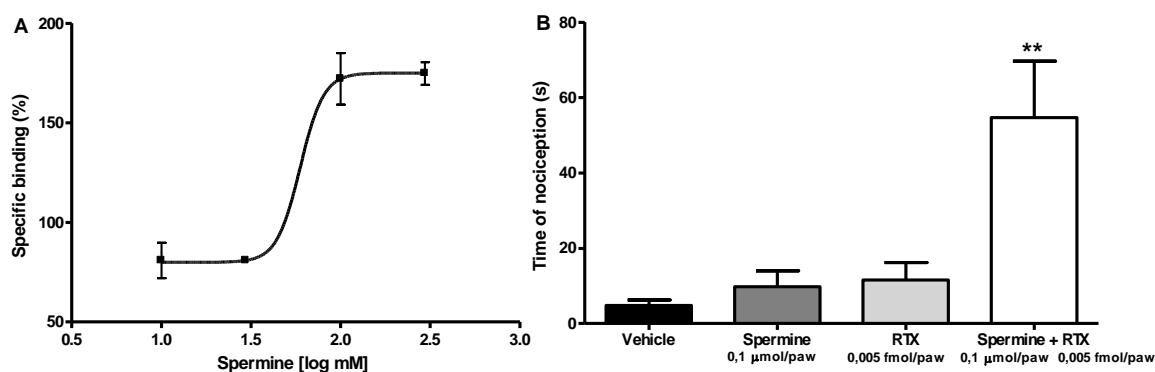


Figure 6. Specific binding of [³H] resiniferatoxin in spinal cord membranes of mice in absence or presence of spermine (3 - 300 µM) in vitro (A). Each point represents the mean±s.e.m of 3 independent experiments performed in duplicate. Nociceptive effect caused by the s.c. co-injection of low doses of spermine (100 nmol/paw) with resiniferatoxin (0.005 nmol/paw) (B). Each column represents the mean±s.e.m of 4-8

mice. Asterisks denote the significance levels. ** $P < 0.01$ compared to control group (B, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test)

Fwd: Submission Confirmation Voltar para mensagens | ↕ ↑

Juliano prof 3/11/2010
Para Camila de Campos Velho Gewehr Responder

----- Forwarded message -----
From: **The Journal of Pain** <jpain@pain.us>
Date: 2010/8/26
Subject: Submission Confirmation
To: ferreira99@gmail.com



Dear Professor Juliano Ferreira,

Your submission entitled "CONTRIBUTION OF VANILLOID RECEPTOR TO THE NOCICEPTION INDUCED BY PERIPHERAL INJECTION OF SPERMINE IN MICE" has been received by The Journal of Pain.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jpain/>.

Your username is: Ferreira99
If you need to retrieve password details,
please go to: http://ees.elsevier.com/jpain/automal_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

PLEASE NOTE: If you haven't yet, please send the required Mandatory Submission Form, signed by all authors. You may download this at http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/jpaincopyright.pdf, and may fax it to  (312) 275-7776 .

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
The Journal of Pain

6 DISCUSSÃO

As poliaminas naturais (putrescina, espermidina e espermina) são aminas alifáticas que contêm dois, três ou quatro grupamentos aminos em sua estrutura molecular (GERNER; MEYSKENS, 2004). Sabe-se que elas possuem função importante no controle da excitabilidade neuronal através da interação direta com diferentes canais iônicos, tais como: receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA e cainato), receptor ASIC e receptor TRPV1 (AHERN; WANG; MIYARES, 2006; BABINI *et al.*, 2002; WILLIAMS, 1997). Todos esses canais iônicos são importantes no desenvolvimento e processamento da nocicepção. Além disso, sabe-se que os níveis de poliaminas encontram-se aumentados em processos inflamatórios tais como: tecido e líquido sinovial, na urina e ainda em leucócitos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide (FURUMITSU *et al.*, 1993; FURUMITSU *et al.*, 2000; YUKIOKA *et al.*, 1992).

No presente trabalho, demonstrou-se que a injeção de poliaminas, na pata de camundongos, produz nocicepção pela estimulação de receptor TRPV1 presente em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro. Por outro lado, a estimulação de receptores NMDA, AMPA/cainato e ASIC parece não ser importante para a nocicepção espontânea induzida por espermina.

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que a espermina e a espermidina, que são as poliaminas que apresentam mais cargas em sua estrutura, foram mais potentes que a putrescina na produção de nocicepção. Esses achados estão de acordo com alguns dados presentes na literatura, os quais demonstram que algumas ações das poliaminas em canais iônicos são dependentes do número de cargas positivas presentes em cada uma dessas moléculas (AHERN; WANG; MIYARES, 2006; WILLIAMS, 1997). O efeito pró-nociceptivo encontrado também está de acordo com resultados prévios que demonstram que uma dieta livre – ou mesmo deficiente – de poliaminas pode gerar ação analgésica (ESTEBE *et al.*, 2006; KERGOZIEN *et al.*, 1996; RIVAT *et al.*, 2007). Então, a restrição na ingestão de poliaminas e a inibição da síntese endógena podem ser alvos interessantes para o controle do processamento da dor.

Conforme descrição da literatura, sabe-se que a modulação de canais iônicos pelas poliaminas incluem receptores ionotrópicos para glutamato, tais como NMDA, AMPA e cainato (WILLIAMS, 1997). O efeito das poliaminas nos diferentes sítios extracelulares do receptor NMDA promove estimulação e, em alguns casos, inibição desse receptor. Isso depende do sítio de ligação a que a poliamina se encontra

ligada, bem como da organização das subunidades do receptor NMDA (JOHNSON, 1996). Dessa forma, experimentos *in vivo* demonstraram uma resposta hiperalgésica produzida pela administração na medula espinhal (intratecal) de espermina em ratos e comportamentos dolorosos em camundongos. Interessantemente, essa resposta foi produzida pela modulação do receptor NMDA, já que antagonistas competitivos desse receptor foram capazes de diminuir o comportamento nociceptivo espontâneo, bem como, a resposta hiperalgésica dos animais tratados com espermina. (KOLHEKAR; MELLER; GEBHART, 1994; TAN-NO *et al.*, 2000). Esses resultados indicam que as poliaminas na medula espinhal podem induzir nocicepção através da estimulação do receptor NMDA.

Segundo a literatura, além da estimulação espinhal, a administração periférica dos agonistas NMDA, AMPA e cainato pode produzir nocicepção em ratos (ZHOU; BONASERA; CARLTON, 1996). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a injeção periférica de antagonista do receptor NMDA MK801 e antagonista do receptor AMPA/cainato DNQX, em doses capazes de inibir a nocicepção causada por glutamato, falharam em alterar a nocicepção produzida pela injeção subcutânea de espermina na pata. Assim, apesar de a estimulação periférica de receptores glutamatérgicos ionotrópicos causar nocicepção, as poliaminas não necessitam desses receptores para produzir sua atividade nociceptiva. Além disso, resultados ora obtidos sugerem que os mecanismos periféricos envolvidos na nocicepção induzida por espermina são diferentes dos mecanismos envolvidos na medula espinhal. No entanto, a redução da nocicepção causada por espermina pelo antagonista NMDA na medula espinhal pode se dar por mecanismo indireto, uma vez que a ativação do receptor TRPV1 pode liberar glutamato. Conforme experimento realizado *in vitro*, foi demonstrado que a capsaicina promove liberação de glutamato na medula espinhal e este efeito foi reduzido pelo antagonista do receptor TRPV1 capsazepina (UEDA; KURAISHI; SATOH, 1993). Além desse resultado, outro estudo realizado em ratos demonstrou que a administração intratecal de capsaicina produz resposta nociceptiva mediada por receptor NMDA e não-NMDA, já que antagonistas administrados por via intratecal dos receptores NMDA e AMPA/cainato foram capazes de diminuir o efeito nociceptivo induzido por capsaicina (OKANO; KURAISHI; SATOH, 1994). Contudo, novos estudos devem ser realizados para elucidar o papel do receptor TRPV1 no SNC na ação nociceptiva das poliaminas administradas por via intratecal.

Outro canal iônico que poderia estar relacionado com a ação nociceptiva das poliaminas é o canal iônico sensível a ácido ASIC-1 (BABINI *et al.*, 2002). Entretanto, na presente pesquisa, observou-se que o bloqueador não seletivo do receptor ASIC amilorida não reduziu a nocicepção produzida por espermina em camundongos em uma dose capaz de diminuir a nocicepção mediada por ácido (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010). Este resultado pode ser explicado pelo fato de o receptor ASIC-1 ter um papel mais relevante na regulação da nocicepção no SNC enquanto o receptor ASIC-3 parece contribuir para o desenvolvimento da dor inflamatória periféricamente (DEVAL *et al.*, 2010). De fato, um estudo realizado recentemente, verificou que o inibidor do receptor ASIC-1 psalmotoxina 1 (PcTx1) possui efeito antinociceptivo semelhante ao efeito produzido pela morfina em testes de dor aguda, quando administrado por via intratecal e intracerebroventricular, mas não apresenta o mesmo efeito quando injetado por via intraperitoneal ou subcutâneo em camundongos (MAZZUCA *et al.*, 2007). Assim, o receptor periférico ASIC-1 parece não ser o alvo pelo qual a espermina produz comportamento nociceptivo periférico.

Além dos receptores ionotrópicos para glutamato e ASIC, as poliaminas são também capazes de estimular diretamente o receptor TRPV1, produzindo mudança iônica seletivas nesse receptor, o que resulta em influxo de Ca^{2+} em neurônio sensorial (AHERN; WANG; MIYARES, 2006; CHUNG *et al.*, 2008). É interessante observar, ainda, que espermina, espermidina e putrescina extracelular ativam diretamente e sensibilizam o receptor de maneira carga-dependente, tanto em sistemas de expressão heterólogos como em neurônios sensoriais (AHERN; WANG; MIYARES, 2006). Nesse sentido, no estudo aqui realizado foi possível demonstrar que tanto a capsazepina quanto o SB366791 reduziram largamente a nocicepção induzida por espermina, demonstrando que o receptor TRPV1 exerce um papel crucial no comportamento nociceptivo causado por poliaminas periféricas.

Foi estabelecido que o tratamento de animais com agonistas do receptor TRPV1, tais como RTX ou capsaicina, é capaz de produzir degeneração seletiva das fibras aferentes primárias TRPV1 positivas, mais especificamente fibras C peptidérgicas, e também, em menor número, das fibras A δ (FERREIRA; SILVA; CALIXTO, 2004; HSIEH *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Sabe-se que a expressão de receptor TRPV1 parece aumentar em fibras mielinizadas em DRG em animais tratados com capsaicina neonatal após lesão parcial de nervo ciático

(RASHID *et al.*, 2003). HSIEH *et al.* (2008) demonstraram que, após sete dias, o grupo tratado sistemicamente com RTX produziu uma redução de 53% na densidade de nervos plantares não mielinizados, bem como uma redução de 88% em neurônios substância P positivos e de 32% em neurônios CGRP positivos, indicando que o RTX produz uma perda em tipos diferentes de neurônios peptidérgicos no DRG. Por sua vez, os dados da presente pesquisa demonstram claramente que o tratamento sistêmico com RTX também reduz significativamente a nocicepção mediada por espermina. Estes resultados fornecem evidências de que espermina e RTX ativam a mesma subpopulação de fibras sensoriais que expressam receptores TRPV1 e, conseqüentemente, produzem um comportamento nociceptivo. A redução da expressão proteica do receptor TRPV1 no nervo ciático confirmou a eficácia do pré-tratamento com RTX, que parece diminuir a expressão de receptor TRPV1 em DRG (RASHID *et al.*, 2003) e, conseqüentemente, reduzir proteína do receptor TRPV1 em terminais nervosos sensoriais.

Em um estudo *in vitro*, verificou-se que cátions – por exemplo, íons H⁺ – são capazes de ativar diretamente o receptor TRPV1 ou sensibilizar este receptor pelo aumento da resposta evocada por capsaicina e calor (JORDT; TOMINAGA; JULIUS, 2000). Nesse mesmo estudo, o resíduo extracelular Glu-600 foi apontado como o local importante para regular a atividade do canal TRPV1 em uma faixa fisiologicamente relevante (pH 6-8). Da mesma forma, esses autores demonstraram que mutações em um segundo sítio extracelular (Glu-648) reduziram as correntes ativadas por prótons sem alterar respostas evocadas por capsaicina e calor (JORDT; TOMINAGA; JULIUS, 2000). Além dos prótons, os cátions divalentes também regulam o TRPV1 pelos mesmos resíduos extracelulares (AHERN *et al.*, 2005). Por isso, Ahern, Wang e Miyares (2006) investigaram a ação das poliaminas (cátions grandes) e o envolvimento desses resíduos na ativação do TRPV1. Os dados obtidos por esse grupo de pesquisadores identificaram a importância dos resíduos ácidos Asp-646 e Glu-648 localizados na região do poro, na modulação do TRPV1 pela espermina, pois a neutralização desses resíduos inibiu a sensibilização induzida por espermina neste canal (AHERN; WANG; MIYARES, 2006). De acordo com esses achados, foi possível demonstrar, no estudo ora discutido, que a espermina aumentou a ligação específica de [³H]-RTX no receptor TRPV1 presente em membrana de medula espinhal de camundongos. Sugere-se, ainda, que RTX e as poliaminas ligam-se em sítios diferentes, já que foi observado um aumento e não

uma competição pelo sítio de ligação. De acordo com evidências da literatura, foram encontrados dois resíduos localizados no domínio intracelular entre S2-S3 que exercem papel crucial para a ligação de RTX nos canais iônicos TRPV1 (JORDT; JULIUS, 2002). Os achados obtidos nesta pesquisa sugerem que as poliaminas ligam-se em sítios alostéricos do receptor TRPV1 e aumenta a afinidade para o sítio vaniloide para esses ligantes. Outro resultado encontrado revelou que a combinação de RTX com espermina – em doses que não produzem nocicepção quando administradas isoladamente – resultou em significativa resposta nociceptiva quando administradas em conjunto. Então, as poliaminas encontradas em tecido inflamatório poderiam aumentar a ligação de endovaniloides no receptor TRPV1 e contribuir para a produção da dor.

Notavelmente, níveis aumentados de poliaminas foram encontrados em amostras de urina e em leucócitos sinoviais de paciente com artrite reumatoide (FURUMITSU *et al.*, 1993). Esse acréscimo também foi demonstrado em tecido e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, artrite reumatoide, pós-traumática e infecciosa (YUKIOKA *et al.*, 1992). Da mesma maneira, há, na literatura, descrições de concentrações maiores que a faixa milimolar de espermina em condições inflamatórias (ZHANG; WANG; TRACEY, 2000). Cabe, aqui, ressaltar que as concentrações da solução de espermina injetada (0,5-150 mM para gerar doses de 0,01-3 $\mu\text{mol/paw}$) na pata de camundongo estão próximas da concentração de espermina encontrada em líquido sinovial de pacientes com artrite (aproximadamente 0,3 mM) (YUKIOKA *et al.*, 1992). Esses achados sugerem que a ação das poliaminas no receptor TRPV1 pode contribuir para a produção de dor, especialmente em condições inflamatórias.

Todos os resultados agrupados demonstram que as poliaminas, provavelmente por serem moléculas catiônicas, podem aumentar a atividade do receptor TRPV1 em terminais nervosos sensoriais periféricos e induzir nocicepção. Além disso, a regulação do receptor TRPV1 em tecidos periféricos pelas poliaminas pode ser relevante para inúmeros estados patológicos dolorosos. Assim, o controle da síntese das poliaminas pode ser um novo alvo farmacológico para o tratamento de dor, principalmente aquela relacionada à inflamação. De fato, nesta pesquisa comprovou-se que a inibição da síntese de poliaminas reduz a nocicepção em um modelo de artrite em ratos (SILVA, 2010). Sabendo que alguns fármacos que reduzem a síntese das poliaminas estão passando por ensaios clínicos para tratar

patologias que apresentam hiperproliferação celular (GERNER; MAYSKENS, 2004; RIVAT *et al.*, 2007), estes mesmos fármacos poderiam ser testados clinicamente para o tratamento de dor, principalmente aquela relacionada à inflamação.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

7.1 A injeção periférica de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) na pata de camundongos produziu comportamento nociceptivo espontâneo.

7.2 O efeito nociceptivo induzido por espermina não foi mediado pela ativação de receptores NMDA, AMPA, cainato e ASIC. No entanto, a ativação do receptor TRPV1 parece ser um importante mecanismo periférico envolvido na nocicepção induzida por espermina em camundongos.

7.3 As fibras TRPV1 positivas são importante mecanismo periférico envolvido no efeito nociceptivo causado por espermina.

7.4 A é capaz de aumentar a afinidade do composto vaniloide RTX ao receptor TRPV1 em camundongos.

REFERÊNCIAS

- AHERN, G. P. *et al.* Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 21, p. 5109-5116, 2005.
- AHERN, G. P.; WANG, X.; MIYARES, R. L. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 13, p. 8991-8995, 2006.
- BABINI, E. *et al.* Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). **J. Biol. Chem.**, v. 44, n.1, p. 41597-41603, 2002.
- BACHRACH, U. The early history of polyamine research. **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 48, n. 7, p. 1-6, 2010.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.
- BRENNAN, F.; CARR, D.B.; COUSINS, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesth Analg.**, v. 105, n. 1, p. 205-221, 2007.
- CALIXTO, J. B. *et al.* Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol. Ther.**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.
- CASERO, R. A.; MARTON, L. J. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 373-390, 2007.
- CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, p. 52-56, 2001.
- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci.** v. 24, p. 487-517, 2001.
- CHAKRADHAR, L. V.; NAIK, S. R. Polyamines in inflammation and their modulation by conventional anti-inflammatory drugs. **Indian J. Exp. Biol.** v. 45, n. 7, p. 649-653, 2007.

- CHUNG, M. K.; GÜLER, A. D.; CATERINA, M. J. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. **Nat. Neurosci.**, v. 11, n. 5, p. 555-564, 2008.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.
- DEVAL, E. *et al.* Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. **Pharmacol Ther.**, v. 128, n. 3, p. 549-58, 2010.
- ESTEBE, J. P. *et al.* An evaluation of a polyamine-deficient diet for the treatment of inflammatory pain. **Anesth. Analg.**, v. 102, n. 6, p. 1781-1788, 2006.
- FERREIRA, J.; SILVA, G.L. da; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 5, p. 787-94, 2004.
- FURUMITSU, Y. *et al.* Levels of urinary polyamines in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 20, n. 10, p. 1661-1665, 1993.
- FURUMITSU, Y. *et al.* Interleukin-1beta induces elevation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity and an increase in the amount of putrescine in synovial adherent cells from patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, n. 6, p. 1352-1357, 2000.
- GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L. Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 10, p. 781-792, 2004.
- JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 1, p. 22-27, 1996.
- JORDT, S. E; TOMINAGA, M.; JULIUS, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 14, p. 8134-8139, 2000.
- JORDT, S. E.; JULIUS, D. Molecular basis for species sensitivity to "hot" chili peppers. **Cell.**, v. 108, n. 3, p. 421-430, 2002.

- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.
- HSIEH, Y. L. *et al.* Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-Methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 67, n. 2, p. 93-104, 2008.
- KERGOZIEN, S. *et al.* Polyamine deprivation provokes an antalgic effect. **Life Sci.**, v. 58, n. 24, p. 2209-2215, 1996.
- KOBAYASHI, K. *et al.* Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, n.4, p. 596-606, 2005.
- KOLHEKAR, R.; MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated changes in thermal nociception: allosteric modulation at glycine and polyamine recognition sites. **Neuroscience**, v. 63, n. 4, p. 925-936, 1994.
- LATORRE, R. *et al.* ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. **Cell Calcium**. v. 42, n. 4-5, p. 427-38, 2007.
- LOESER J. D.; TREEDE R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 437-477, 2008.
- LINLEY, J. E *et al.* Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Eur. J. Physiol.**, v. 459, n. 5, p.:657-669, 2010.
- MAZZUCA, M. *et al.* A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. **Nat. Neurosci.**, v. 10, n. 8, p. 943-945, 2007.
- MEOTTI, F. C.; COELHO, I. DOS S.; SANTOS, A. R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J. Pain**, v. 11, n. 6, p. 570-578, 2010.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain**. EUA: Ed. Seattle, 1994, 209-214 p.

- OKANO, K.; KURASHI, Y.; SATOH, M. Involvement of substance P and excitatory amino acids in aversive behavior elicited by intrathecal capsaicin. **Neurosci. Res.**, v. 19, n. 2, p. 125-130, 1994.
- RASHID, M. H. *et al.* Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 304, n. 2, p. 940-948, 2003.
- RIVAT, C. *et al.* Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. **Pain**, v. 137, n. 1, p. 125-137, 2007.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci.** v. 5, p 1062-1067, 2002.
- SCOTT, R. H.; SUTTON, K. G.; DOLPHIN, A. C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. **Trends. Neurosci.**, v. 16, n. 4, p. 153-160, 1993.
- SEILER, N.; DELCROS, J. G.; MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, n. 8, p. 843-861, 1996.
- SEILER, N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. *In: Neuropharmacology of Polyamines.* Editora Academic Press, p.26-36, 1994.
- SEILER, N. Pharmacological aspects of cytotoxic polyamine analogs and derivatives for cancer therapy. **Pharmacol. Ther.** v. 107, n. 1, p. 99-119, 2005.
- SILVA, M. A. **Papel das poliaminas periféricas no desenvolvimento da dor inflamatória em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- TAN-NO, K. *et al.* Intrathecally administered spermine produces the scratching, biting and licking behaviour in mice. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 55-61, 2000.
- TETI, D.; VISALLI, M.; M. C.; NAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 781, n. 1-2, p. 107-149, 2002.

- TRAYNELIS, S. F. *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev.**, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010.
- UEDA, M.; KURASHI, Y.; SATOH, M. Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system. **Neurosci. Lett.**, v. 155, n. 2, p. 179-182, 1997.
- WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; BASSILANA, F.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature** v. 386, n. 6621, p. 173-177, 1997.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol. Rev.**, v. 82, n. 4, p. 981-1011, 2002.
- WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; MOLINOFF, P. B. Effects of polyamines on the binding of [³H] MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Mol. Pharmacol.**, v. 36, n. 4, p. 575-581, 1989.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem. J.**, v. 325, n. Pt 2 p. 289-297, 1997.
- YUKIOKA, K. *et al.* Polyamine levels in synovial tissues and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 19, n. 5, p. 689-692, 1992.
- ZHANG, M.; WANG H.; TRACEY, K. J. Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapin an old soty. **Crit. Care Med.**, v. 28, n. 4, p. 60-66, 2000.
- ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S. M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviours in rats. **Neuroreport**. v. 7, n. 4, p 895–900, 1996.