



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

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL  
TRANSITÓRIO A1(TRPA1) EM UM MODELO DE DOR  
NEUROPÁTICA MANTIDA PELO SIMPÁTICO EM  
CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Francielle de Vargas Pinheiro**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2012**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO A1  
(TRPA1) EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA MANTIDA PELO  
SIMPÁTICO EM CAMUNDONGOS**

---

**Por**

**Francielle de Vargas Pinheiro**

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 a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eunice André**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Vargas Pinheiro, Francielle  
ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO A1  
(TRPA1) EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA MANTIDA PELO  
SIMPÁTICO EM CAMUNDONGOS / Francielle de Vargas  
Pinheiro.-2012.  
79 f.; 30cm

Orientadora: Eunice André  
Coorientadora: Juliano Ferreira  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Dor Neuropática 2. Receptor de Potencial  
Transitório Anquerina 1 3. Norepinefrina I. André, Eunice  
II. Ferreira, Juliano III. Título.

**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

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO A1  
(TRPA1) EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA MANTIDA PELO  
SIMPÁTICO EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

**Francielle de Vargas Pinheiro**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Dr<sup>a</sup> Eunice André (Orientador)**

---

**Dr. Juliano Ferreira (Co-orientador)**

---

**Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda de Paula Werner (UFPR)**

---

**Dr<sup>a</sup> Roselei Fachinnetto (UFSM)**

Santa Maria, 26 de maio de 2012

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Eunice André, pela orientação ao longo do mestrado. Pelo exemplo, pelo incentivo e por compartilhar sua visão científica.

Ao meu co-orientador, professor Juliano Ferreira, pela excelente orientação, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência e compreensão e, acima de tudo, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Á Deus, pela vida e saúde para encarar com serenidade as dificuldades do cotidiano.

À minha família por me ensinar a acreditar nos meus sonhos.

Aos meus pais, Juarez e Nair, é uma preciosidade ter como pai e mãe estes dois exemplos de vida...obrigada pelo apoio incondicional, amor, paciência, força e otimismo, amo vocês.

Á minha querida irmã Kelly, pela “força do cooperativismo”, ajuda imprescindível e incondicional, pela lição de amor e alegria diária, você tornou isso possível obrigada por tudo, amo você.

Á minha avó, Tereza pela força, dedicação, carinho e incentivo, és muito especial para mim.

Ao meu amor, Mickel, pelo cuidado, carinho e tranqüilidade!

Aos queridos amigos e colegas do LabNeuro, que me receberam tão bem, pelas valiosas discussões sobre projetos, pela ajuda na execução dos experimentos e acima de tudo pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilização de recursos para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste curso, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...  
Que já têm a forma do nosso corpo ...  
E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos  
mesmos lugares ...  
É o tempo da travessia ...  
E se não ousarmos fazê-la ...  
Teremos ficado ... para sempre ...  
À margem de nós mesmos...”  
(*Fernando Pessoa*)

*"No que diz respeito ao desempenho,  
ao compromisso,  
ao esforço,  
à dedicação,  
não existe meio termo.  
Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz."*

*(Ayrton Senna)*

## RESUMO

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

### **ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO A1 (TRPA1) EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA MANTIDA PELO SIMPÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Autora: Francielle de Vargas Pinheiro

Orientador: Eunice André

Co-orientador: Juliano Ferreira

Local e data da Defesa: Santa Maria, 26 de maio de 2012.

Algumas formas de dor neuropática são mantidos por fibras simpáticas, contudo os mecanismos subjacentes são pouco compreendidos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o possível envolvimento do receptor TRPA1, bem como o papel do sistema nervoso simpático num modelo de dor neuropática induzido pela constrição crônica do nervo ciático (CCI) em camundongos. A administração sistêmica do antagonista seletivo do receptor TRPA1, HC-030031, reverteu a alodinia mecânica e ao frio induzida pela CCI. A injeção de uma baixa dose do agonista do receptor TRPA1, isotiocianato de alila, induziu uma resposta nociceptiva nos animais que sofreram a lesão no nervo, sem alterar a imunorreatividade do TRPA1 na pata injetada. Além disso, a simpatectomia química produzida pela guanetidina amplamente previniu a alodínia mecânica e ao frio induzida pela CCI. Ainda, a injeção intraplantar de norepinefrina induziu nocicepção espontânea, a qual foi reduzida pelo antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, inibidor do transportador de norepinefrina e inibidor da enzima monoamina oxidase.

Finalmente, a administração periférica do HC-030031 reduziu a nocicepção espontânea induzida pela norepinefrina e também a alodínia mecânica e térmica de animais neuropáticos. Assim, nossos resultados revelam o papel crítico do receptor TRPA1 na alodínia mecânica e ao frio, bem como na hipersensibilidade à

norepinefrina após lesão do nervo em um modelo de dor neuropática mantida pelo simpático. Dessa forma, o receptor TRPA1 poderá ser um alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos para esse tipo de dor.

**Palavras-chave:** Condição Crônica do Nervo Ciático; antagonista TRPA1; norepinefrina; adrenoreceptor; alodínia frio; alodínia mecânica.



## **ABSTRACT**

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

### **INVOLVEMENT OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL A1(TRPA1) ON MODEL OF NEUROPATHIC PAIN SYMPATHETICALLY MAINTAINED IN MICE**

Author: Francielle de Vargas Pinheiro

Advisor: Eunice André

Co-Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, may, 26<sup>th</sup>, 2012.

Some forms of neuropathic pain are maintained by sympathetic fibers, but the underlying mechanisms are poorly understood. Thus, the aim of this study was to investigate the possible involvement of the TRPA1 receptor as well as the role of the sympathetic nervous system (involved in sympathetically maintained neuropathic pain) in a model of neuropathic pain induced by chronic sciatic nerve constriction injury (CCI) in mice. The systemic injection of the selective TRPA1 antagonist HC-030031 reversed both mechanical and cold allodynia induced by chronic sciatic nerve constriction injury. Nerve injury also sensitizes mice to the nociception induced by the intraplantar injection of a low dose of the TRPA1 agonist allyl isothiocyanate without changing TRPA1 immunoreactivity in the injected paw. Furthermore, the chemical sympathectomy produced by guanethidine largely prevented CCI-induced mechanical and cold allodynia. CCI also induced a norepinephrine-triggered nociception that was inhibited by  $\alpha$ -adrenoceptor antagonism and norepinephrine transporter and monoamine oxidase inhibition. Finally, the peripheral injection of HC-030031 also largely reduced CCI-induced nociception by norepinephrine and mechanical or cold allodynia. Taken together, the present findings reveal the critical role of TRPA1 in mechanical and cold hypersensitivity as well as in hypersensitivity to norepinephrine following nerve injury. This article presents the role of TRPA1 receptor on the sympathetically-maintained nociception induced by nerve injury in

mice. Our results suggest that TRPA1 antagonists may be useful to treat neuropathic patients that present sympathetically maintained pain.

**Key words:** chronic constriction injury; TRPA1 antagonist; norepinephrine; adrenoceptor; cold allodynia; mechanical allodynia.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1:** Ativação do receptor TRPA1 por alguns agonista.....21

### MANUSCRITO

**Figure 1.** TRPA1 antagonist reduced neuropathy-induced mechanical allodynia in mice.....49

**Figure 2.** TRPA1 antagonist reduced neuropathy-induced cold allodynia in mice.....50

**Figure 3.** TRPA1 agonist-induced nociception in neuropathic mice.....51

**Figure 4.** CCI-induced nociception is sympathetically maintained.....52

**Figure 5.** Peripheral mechanisms involved in NE-induced nociception in neuropathic mice.....53

**Figure 6.** Peripheral TRPA1 receptor is involved in NE-induced nociception, cold and mechanical allodynia caused by nerve injury.....54

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
MAO	Monoamina oxidase
DOPEGAL	3,4-dihidroxiifenilglicolaldeído
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
NE	Norepinefrina
CCI	Constricção crônica do nervo ciático
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ng	Nanograma
pg	Picograma
µg	Micrograma
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
µL	Microlitro
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>6</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Dor .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.1 Dor considerações gerais .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.2 Dor Neuropática.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2.1 Dor mantida pela atividade simpática.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Controle da dor neuropática.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Receptores de Potencial Transitório (TRPs).....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.1 Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1).....</b>	<b>19</b>
<b>4. ARTIGO .....</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta dissertação.

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, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÃO**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

---

## 1. INTRODUÇÃO

A dor neuropática segundo o Comitê de Taxonomia da IASP é definida como “uma consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial” (LOESER & TREEDE, 2008). É uma dor relativamente comum, acometendo aproximadamente 1% da população (NICHOLSON, 2000). Essa dor está associada a diversos tipos de injúria do sistema nervoso, podendo ser iniciada após lesão nervosa, uso crônico de determinadas drogas ou associada a algumas patologias e alterações metabólicas como a diabetes (CHONG *et al.*, 2003).

Assim, a geração e a modulação da dor neuropática envolvem tanto mecanismos periféricos quanto centrais (WHITE *et al.*, 2007). A lesão de nervos periféricos está freqüentemente acompanhada de inflamação local transitória, contribuindo para o início da sensação dolorosa. Nesse sentido, como na dor inflamatória, na dor neuropática também estão envolvidos alguns mediadores inflamatórios (JI e STRICHARTZ, 2004). Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não estão bem compreendidos. No entanto, segundo MacFarlane e colaboradores (1997) o desenvolvimento de dor crônica após lesão do nervo pode ocorrer através de alterações no corno dorsal da medula espinhal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e, eventualmente, mudança no fenótipo. Essas alterações ocorrem principalmente devido a uma estimulação excessiva de fibras nervosas aferentes primárias (nociceptores), uma vez que estes estão com limiar de ativação mais baixo (hipersensibilidade) (COUTAUX *et al.*, 2005).

Além disso, as neuropatias periféricas estão associadas à disfunção e morte neuronal. Evidências sugerem que essa morte celular esteja em parte, associada a efeitos neurotóxicos intracelulares gerados por metabólitos de catecolaminas, como espécies reativas de oxigênio e principalmente o 3,4-diidroxifenilglicolaldeído



(DOPEGAL), devido ação da enzima monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) (DINA et al., 2008).

A MAO é uma flavoproteína localizada na membrana mitocondrial externa de diversas células, como neurônios e células da glia, e que catalisa a desaminação oxidativa de diversas aminas, incluindo a noradrenalina (SHIH et al., 1999; YOUDIM et al., 2006). Esses fatores associados à sensibilização central podem contribuir para o desenvolvimento de dor espontânea, de hiperalgesia e alodínia característico de pacientes que sofrem com dores do tipo neuropática (SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Considera-se a existência de dois tipos de dor neuropática: a dor mantida pela atividade simpática e a dor independente desta atividade (DEVOR et al., 1994). No primeiro caso, sugere-se que neurônios sensoriais na região da lesão apresentam aumento da resposta nociceptiva à adrenalina circulante ou noradrenalina liberada das terminações simpáticas pós-ganglionares (SELTZER, 1999).

Na última década, muitas moléculas de transdução da nocicepção têm sido identificadas sendo a família dos receptores de potencial transitório (TRP) o maior grupo de detectores de estímulos nocivos (PATAPOUTIAN et al., 2009). Alguns estudos têm demonstrado que a dor neuropática pode ser mediada por alguns membros da superfamília TRP (LEVINE et al, 2007;. DUBIN et al, 2010;. MARTINS et al., 2010).

Desta família destacaremos o receptor TRP do tipo anquirina 1 (TRPA1) que foi primeiramente descrito como sendo ativado por temperaturas mais baixas que 17°C (STORY et al., 2003; CALIXTO et al., 2005; PATAPOUTIAN, TATE, WOOLF, 2009). Esses receptores são ativados por estímulos mecânicos e substâncias pungentes derivadas de plantas incluindo o isotiocianato de alila (derivada da

mostarda amarela), o cinamaldeído (derivada da canela), a alicina (presente no alho), além de ativadores endógenos como produtos de peroxidação lipídica (4-hidroxinonenal) e espécies reativas de oxigênio (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; MAPHERSON et al., 2005; TREVISANI et al., 2007).

Como o receptor TRPA1 pode ser encontrado nas terminações e nos corpos celulares de neurônios sensoriais, sua ativação pode estar relacionada com mecanismos de desenvolvimento de dor (CATERINA et al., 1997). Dessa forma, considerando que modelos animais de neuropatia permitem explorar esses mecanismos, o presente estudo pretende avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 em um modelo animal de lesão por constrição crônica do nervo ciático (CCI). Como o metabolismo da noradrenalina induz produção de espécies químicas reativas, o TRPA1 sendo um sensor destas espécies pode estar envolvido com o desenvolvimento de alguns tipos de dor neuropática.

Mais recentemente, animais expostos ao modelo de CCI demonstraram atividade espontânea aumentada nos neurônios aferentes primários, expansão simpática no gânglio da raiz dorsal e redução do número de axônios mielinizados que promovem condução do estímulo doloroso no local da lesão (CHUDLER & ANDERSON, 2002).

Diante das evidências acima citadas parece que o receptor TRPA1 poderia apresentar um papel crítico no desenvolvimento da dor neuropática mantida pelo sistema nervoso simpático em camundongos. Assim, o receptor TRPA1 poderia ser um alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos para esse tipo de dor.

---

## **2. OBJETIVOS**

**2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 em um modelo de dor neuropática mantida pelo sistema nervoso simpático em camundongos.

**2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Avaliar o envolvimento do receptor de potencial transitório TRPA1 sobre a alodínia mecânica e ao frio no modelo de dor neuropática da CCI;

2.2.2. Verificar a imunoreatividade do receptor TRPA1 no nervo ciático e na pata de animais falso-operados e neuropáticos;

2.2.3. Verificar uma possível participação do sistema nervoso simpático no modelo de dor neuropática CCI;

2.2.4. Investigar o possível envolvimento de mecanismos periféricos na nocicepção induzida pela norepinefrina em animais neuropáticos.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Dor**

#### **3.1.1 Dor considerações gerais**

O termo dor, conforme a Associação Internacional para o Estudo da Dor ("IASP"-International Association for the Study of Pain), conceitua-se como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual atual ou potencial (Pain 1986).

A dor aguda tem função biológica de preservação de integridade e defesa, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Por outro lado, a dor muitas vezes evolui de um sistema de alerta para uma dor crônica e debilitante. A dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda de funcionalidade e da qualidade de vida. Apesar dos avanços nas diversas áreas de conhecimento relacionadas à dor, como epidemiologia, fisiopatologia e terapêuticas, os resultados dos tratamentos como prevenção das recorrências ainda não são satisfatórios (JULIUS & BASBAUM 2001).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que 20% dos indivíduos em todo o mundo apresentam algum grau de dor crônica (TURK et al., 2011). No Brasil não existem informações precisas, já nos Estados Unidos 31% da população tem dor crônica, o que representaria 86 milhões de norte americanos, ocorrendo uma incapacidade total ou parcial em 75% deles (65 milhões) (Panchal S. John Hopkins Medical School. 2000). As estimativas para o custo total desse tipo de dor excedem 210 milhões de dólares anualmente nos EUA, enquanto que no Reino Unido, o custo estimado fica entre 26 á 49 bilhões de dólares a cada ano (TURK et al., 2011).

A dor crônica não oncológica é geralmente definida como uma dor com duração superior a 3 meses ou além do esperado período de cicatrização do tecido lesado. A intensidade da dor, no entanto não está correlacionada com a quantidade de dano e os sintomas podem persistir por muito tempo depois da lesão tecidual (GATCHEL 2007, CHENG 2010). Pesquisas sugerem que a dor crônica pode ser resultado de um estímulo constante de nociceptores devido a alterações teciduais provocadas por uma lesão aguda, doença, danos no sistema nervoso periférico, central ou ambos. Este tipo de dor não é facilmente detectável com as tecnologias de diagnóstico atualmente disponíveis (CHENG 2010, TURK et al.,2011).

A dor é uma experiência complexa que envolve a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas também seu processamento cognitivo e emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS & BASBAUM, 2001). Considerando essa definição, pode-se citar um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional, e a junção de ambos é o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, em animais avalia-se a dor de forma indireta. Uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional, avalia-se somente o componente fisiológico, o qual é denominado nocicepção. Assim, torna-se importante distinguir os termos dor e nocicepção. O primeiro refere-se a percepção de sensações evocadas por mecanismos lesivos diversos enquanto que o segundo reflete as manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo (ALMEIDA et al., 2004).

Nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas de nociceptores. Os nociceptores são os responsáveis pela percepção do estímulo nocivo, caracterizados por terminais periféricos de neurônios sensitivos primários cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e no gânglio trigeminal (GT). São classificados em três classes principais: nociceptores térmicos (ativados por temperaturas extremas  $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mecânicos (ativados por pressão intensa aplicada na pele) e polimodais (ativados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos de alta intensidade) (JULIUS & BASBAUM 2001, BASBAUM et al 2009).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por meio das fibras aferentes até o SNC. A transmissão da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias do tipo C e A $\delta$ , as quais possuem terminações sensoriais (nociceptores) nos tecidos periféricos e são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, os quais serão responsáveis pelo desencadeamento de potenciais de ação. Estas fibras possuem elevado limiar de ativação. As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas A $\delta$ , conduzem mais rapidamente os estímulos periféricos, sendo ativadas por estímulos mecânicos e térmicos. As fibras C, denominadas nociceptores polimodais possuem baixa velocidade de condução, pois não apresentam mielina e são ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Estas fibras apresentam percepção lenta e resposta de longa duração (dor lenta), as

fibras C podem também ser classificadas como peptidérgicas e não-peptidérgicas (LOESER, 2001, MEYER et al, 2008, BASBAUM et al 2009).

As fibras C peptidérgicas sintetizam peptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores TrkA para o fator de crescimento do nervo (NGF). Já as não peptidérgicas são identificáveis pela presença da isolectina IB4, por expressarem receptores purinérgicos excitatórios da subclasse P2X<sub>3</sub> ao trifosfato de adenosina (ATP), em suas terminações nervosas, bem como por dependerem de outra neurotrofina, fator de crescimento de nervo derivado de células gliais (GDNF), para se desenvolverem (CUELLO et al.,1993, KASHIBA et al., 1996). As fibras mielinizadas de condução rápida A $\beta$ , detectam estímulos suaves e não dolorosos aplicados na pele, músculos e articulações, contribuindo para a propriocepção (informar a posição do corpo no espaço) sem responder diretamente a estímulos nocivos (LOESER, 2001, BASBAUM et al 2009).

A organização da medula espinhal em lâminas compostas por fibras distintas quanto às características moleculares e eletrofisiológicas reflete o papel das diferentes porções da medula na condução de diferentes estímulos. Análises eletrofisiológicas mostram que os neurônios presentes na lâmina I respondem geralmente á estímulos nocivos (via fibras C e A $\delta$ ), enquanto que os neurônios das lâminas III e IV respondem primariamente á estimulação inócua (via fibras A $\beta$ ). Já a porção mais profunda do corno dorsal da medula espinhal, a lâmina V, recebe projeções convergentes de neurônios que respondem a estímulos nocivos (via fibras A $\delta$ ) e daqueles que reconhecem estímulos inócuos (via fibras A $\beta$ ) (BASBAUM et al, 2009).

A lesão de tecidos ou nervos não apenas ativa as fibras nociceptivas produzindo dor aguda como também inicia uma série de mudanças nas propriedades dos nociceptores e dos neurônios da medula espinhal (JI E WOOLF, 2001). Essas alterações, dependendo do grau e da duração, podem gerar um estado de dor persistente, em que há uma resposta exacerbada de dor a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) ou inócuos (alodínia), ou ainda podem produzir sensação de dor na ausência de qualquer estímulo externo (dor espontânea) (BESSION, 1999).

O potencial de ação na fibra nervosa sensorial é desencadeado de acordo com o estímulo nociceptivo. A sensibilização dos nociceptores ocorre, por exemplo,



em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico) ou através de distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resultando na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, SP, NO, opióides e acetilcolina, entre outros como alterações drásticas no fenótipo celular (expressão de neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores) e a mudanças estruturais, como a perda de interneurônios espinhais, rearranjos inapropriados de neurônios na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas nos gânglios sensoriais (JULIUS & BASBAUM 2001, BABA & WOOLF, 2000; MOORE et al., 2002, GRIFFIS et al., 2006).

### **3.1.2 Dor Neuropática**

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define-a como “dor que aparece como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial” (IASP newsletter 2011). A dor neuropática afeta milhões de pessoas em todo o mundo, embora não sejam conhecidos dados exatos (DWORKIN et al., 2007). Os doentes apresentam habitualmente dor crônica que freqüentemente não cede à terapêutica, causando uma considerável diminuição da sua qualidade de vida e dificultando a capacidade de trabalho acarretando assim, um grande encargo econômico à sociedade (FREYNHAGEN et al., 2009).

A prevalência global de dor neuropática na população geral é difícil de quantificar, devido ao grande número de causas subjacentes e falta de métodos de medição consistentes. Apesar disso, supõe-se que 6-8% da população mundial apresente dor crônica com características neuropáticas (TORRANCE et al 2006, HAANPAA et al., 2009).

As causas mais comuns da dor neuropática estão principalmente associadas a lesões de nervos periféricos devido ao trauma (por exemplo: amputação, compressão), drogas (como vincristina, cisplatina, taxol), desordens metabólicas como o diabetes, neuropatias associadas a doenças como o câncer e a AIDS (WOOLF e SALTER, 2000; ALEY e LEVINE, 2002).

Na prática clínica, tem sido extensivamente descrito que a dor neuropática é de difícil tratamento, pois envolve etiologias distintas e, principalmente, porque os mecanismos celulares e moleculares envolvidos são complexos e até o momento pouco entendidos (ALEY e LEVINE, 2002; HARDEN e COHEN, 2003). No entanto, sabe-se que tanto o sistema nervoso periférico quanto o sistema nervoso central estão implicados na gênese da dor neuropática (SCHWARTZMAN et al., 2001).

A dor crônica como a neuropatia não tem qualquer função biológica de proteção, e é caracterizada por alterações funcionais e estruturais das vias sensitivas periféricas e centrais (GALLUZZI 2007). As alterações iniciais ocorridas nos nervos aferentes primários causam diminuição do limiar de sensibilidade dos nociceptores e reforço dos impulsos transmitidos à medula espinhal. Um mecanismo importante de indução da dor neuropática periférica parece ser a atividade ectópica espontânea de neurônios sensitivos primários axotomizados ou intactos, cujos corpos celulares se encontram no mesmo DRG, resultando em amplificação da dor (sensibilização periférica, com hiperalgesia, e alodínia). Assim, quando a área afetada é estimulada podem ocorrer os fenômenos de alodinia (sensação de dor devido à estimulação não nociva, mecânica, térmica ou química) e hiperalgesia (resposta aumentada à dor após um estímulo nocivo) (FINNERUP & JENSEN, 2004; FREYNHAGEN et al., 2009; CRUCCU et al 2009). Ainda sabe-se que essa atividade ectópica e espontânea das fibras sensoriais produzida pela lesão de nervos periféricos é capaz de tornar essas fibras mais sensíveis a estimulação pela noradrenalina (McLACHLAN et al., 1993, WOOLF E MANNION, 1999).

Ainda a hiperexcitabilidade dos aferentes primários causa uma resposta aumentada pelos neurônios da medula espinhal (sensibilização central), durante a sensibilização central ocorrem alterações eletrofisiológicas como o “wind up” (facilitação dependente do uso), na qual os neurônios da medula espinhal, ao receberem estímulos de pequenas fibras, geram potenciais de ação repetidos após cada estimulação e que produz hiperalgesia secundária (hiperalgesia mecânica na pele que rodeia a área lesada) (FAZEN e RINGKAMP 2007; GALLUZZI et al 2007;BOYCE-RUSTAY JARVIS 2009). A sensibilização central envolve uma série de eventos que alteraram a neurobiologia da dor. Diante de condições patológicas em que a estimulação dos nociceptores encontra-se aumentada, a transmissão nociceptiva é alterada, ocorrendo mudanças no potencial de membrana celular, as quais levam à ativação de canais iônicos, como canais de sódio e canais de cálcio

dependentes de voltagem (CCDV), levando então a um aumento na liberação de neurotransmissores, como o glutamato, e a facilitação da transmissão excitatória que, através da ativação de canais iônicos dependentes de voltagem ou operados por ligantes e da liberação de estoques intracelulares, produz elevação nos níveis de cálcio. O aumento da concentração de cálcio intracelular inicia inúmeros processos de sinalização celular (JI E WOOLF, 2001).

Além disso, a alteração da excitabilidade pode advir de alterações na expressão de genes e do fenótipo protéico (expressão de neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores), como a expressão em neurónios muito mielinizados do factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da substância P e do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), normalmente expressos apenas em neurónios de pequeno diâmetro (CAMPBELL et al., 2006; FAZEN e RINGKAMP 2007; KLUSAKOVA et al., 2009) e a mudanças estruturais, como a perda de interneurónios espinhais, rearranjos inapropriados de neurónios na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas nos gânglios sensoriais (MOORE, BABA e WOOLF, 2000; MOORE et al., 2002). Ainda sabe-se que a lesão de nervos periféricos produz atividade ectópica e espontânea de fibras sensoriais (WOOLF E MANNION, 1999).

Como muitos pacientes que sofrem de dor neuropática possuem lesão parcial de um nervo, vários modelos refletindo esta condição têm sido desenvolvidos. Sendo a constrição crônica do nervo ciático um dos modelos mais utilizados. O modelo de lesão por constrição crônica é um modelo de mononeuropatia (BENNETT e XIE, 1988), onde um fio de sutura é passado ao redor do nervo ciático e fortemente amarrado resultando em perda substancial tanto de fibras mielinizadas, quanto não mielinizadas na porção distal a ligadura (BASBAUM et al., 1991; KAJANDER and BENNETT, 1992). Esse tipo de lesão resulta em pata afetada recolhida, comportamento defensivo espontâneo, assim como alodínia ao frio ou a estímulo mecânico e hiperalgesia para estímulos térmicos (BASBAUM et al., 1991; KLUSAKOVA e DUBOVY 2009). Ainda, esse modelo simula doenças como a Síndrome do túnel cárpico e hérnia discal lombar (NIEDERBERGER et al., 2008; COSTIGAN et al., 2009).

### **3.1.2.1 Dor mantida pela atividade simpática**

Por causa da sua heterogeneidade e complexidade, a dor neuropática é de difícil classificação. Em geral, considera-se que existam dois tipos de dor neuropática, a dor mantida pela atividade simpática (DMS) e a dor independente desta atividade (DIS) (STANTON-HICKS et al., 1995).

Na dor neuropática mantida pelo sistema nervoso autonômico simpático, após a lesão de nervos, fibras aferentes primárias passam a expressar adrenoceptores, sendo sensibilizados por catecolaminas circulantes e noradrenalina liberada de terminações simpáticas pós-ganglionares. Estas catecolaminas podem atuar reduzindo o limiar de resposta nos nociceptores (DEVOR et al., 1994, JANIG e BARON, 2003; Nickel et al 2011).

Normalmente, o DRG é desprovido de inervação simpática, exceto pela presença de fibras simpáticas perivasculares. Contudo, tem sido observado que a ligação dos nervos espinhais induz a emergência de fibras simpáticas, as quais se entrelaçam ao redor do corpo celular de neurônios aferentes sensoriais lesados ou intactos (BOUCHER et al., 2000).

Este rearranjo, que forma estruturas semelhantes a cestos, associado ao aumento dos níveis de catecolaminas circulantes (noradrenalina liberada nos neurônios aferentes hiper-responsivos) e da expressão de adrenoceptores, os quais interagem com agonistas adrenérgicos na membrana celular dos neurônios, permite que os neurônios mielinizados desenvolvam descargas ectópicas que parecem contribuir para a hipernocicepção (DEVOR 2004, XIE et al., 2001, NICKEL et al 2011).

Além disso, Dina e colaboradores (2008) sugerem através de um modelo de neuropatia alcoólica em ratos que a formação do aldeído neurotóxico DOPEGAL, o qual é originado a partir da metabolização da noradrenalina pela MAO dentro de neurônios possa estar envolvido na indução de nocicepção.

Mecanismos indiretos também podem contribuir para a dor mantida pelo SNS. Atividade vasomotora mediada simpaticamente leva a alterações na microcirculação, prejudicando a nutrição e a oxigenação. Também a inflamação é em parte regulada pelo sistema nervoso simpático, por exemplo a bradicinina induz extravasamento

plasmático dependente de estruturas intactas do sistema periférico simpático (NICKEL et al., 2011).

### **3.2. Controle da dor neuropática**

Os medicamentos preconizados atualmente para o tratamento da dor neuropática têm ainda uma eficácia imprevisível, sendo que cerca de 40-60% dos doentes obtêm apenas alívio parcial. Devido ao seu caráter multifatorial, uma série de sinais e sintomas da dor neuropática podem variar ao longo do tempo, o que torna ainda mais difícil o controle da doença (O'CONNOR et al., 2009).

Na conduta terapêutica consideram-se métodos não farmacológicos como a redução do estresse, uma boa higiene do sono, fisioterapia, técnicas de estimulação elétrica transcutânea, eletroacupuntura e algumas intervenções cirúrgicas (GALLUZZI 2007; JENSEN e FINNERUP et al.,2007; FREYNHAGEN et al.,2009). Contudo, a terapêutica farmacológica ainda é o componente principal do tratamento. Em geral, a terapêutica consiste da utilização de analgésicos tradicionais (opióides e antiinflamatórios não-esteroidais- AINEs), anestésicos locais (adesivos de lidocaína 5% e capsaicina), além de fármacos que não foram originalmente desenvolvidos para o tratamento de dor, como anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos, considerados os melhores fármacos para este tipo de dor (WERMELING e BERGER, 2006; TURK et al .,2011).

Antidepressivos tricíclicos têm um grande número de ações, particularmente a capacidade de inibir a recaptação de serotonina e noradrenalina de terminais pré-sinápticos e o reforço das vias inibitórias do tronco cerebral, por antagonismo de receptores NMDA. Além disso, bloqueiam vários receptores (colinérgicos, adrenérgicos, histaminérgicos e de canais iônicos), apresentando assim efeitos secundários (JENSEN e FINNERUP 2007). Alguns dos efeitos indesejados incluem eventos cardiovasculares como hipertensão e arritmias. Pertence a esse grupo de medicamentos a amitriptilina, nortriptilina e desipramina (DECOSTERD e WOOLF 2000; TURK et al., 2011).

Estudos clínicos sugerem que os opióides apresentam efeitos analgésicos modestos em certas condições neuropáticas. Contudo, essas drogas causam tolerância e dependência, além de outros efeitos colaterais significativos como sedação, náuseas, constipação, retenção urinária, entre outros. Diretrizes de

Associações Internacionais para o Estudo da Dor neuropática recomendam opióides como tratamento de segunda ou terceira linha podendo ser considerado como de primeira linha apenas em circunstâncias clínicas específicas, como durante uma crise grave de dor neuropática (TURK et al.,2011). A eficácia dos AINEs tem sido relatada em pacientes com osteoartrite e dores na artrite reumatóide. Os AINEs são geralmente ineficazes para dor neuropática, no entanto, pesquisas são necessárias para estabelecer sua eficácia nesse distúrbio (TURK et al.,2011).

O efeito analgésico dos AINEs resulta do bloqueio da síntese de prostaglandinas (PGs) pró-nociceptivas, através da inibição de isoformas da enzima cicloxigenase (COX). Assim, apesar dos AINEs serem os fármacos de escolha para tratar a dor de origem inflamatória, ainda não existe um consenso na literatura sobre sua eficácia analgésica no tratamento da dor neuropática. Nesse sentido, tem sido observado que em modelos animais de dor neuropática, os AINEs apresentam uma importante ação analgésica por inibirem a síntese de PGs tanto a nível periférico como central (TAKAHASHI et al., 2004; TURK et al 2011). Tem sido sugerido ainda que o emprego de AINEs possa trazer benefícios em alguns casos de dor neuropática, principalmente quando utilizados em associação com outros tratamentos (BARON e BINDER, 2004). Contudo, é necessário considerar que o uso crônico de AINEs promove efeitos colaterais importantes, como sérios danos gástricos além de disfunções renais e cardíacas (BEJARANO e HERRERO, 2003; TURK et al 2011).

Atualmente, o tratamento com drogas que reduzem a excitabilidade dos neurônios, como carbamazepina ou gabapentina vêm sendo difundido. Os anticonvulsivantes foram empregados inicialmente para o tratamento da dor neuropática trigeminal e da neuropatia diabética, sendo mais tarde utilizados também em outros tipos de neuropatias (FINNERUP et al., 2005). A supressão da hiperexcitabilidade neuronal pode ocorrer através do bloqueio de canais de sódio e/ou cálcio, do aumento da neurotransmissão gabaérgica e da redução da neurotransmissão glutamatérgica, todos intimamente relacionados com o efeito analgésico de anticonvulsivantes na dor neuropática. Contudo, alguns anticonvulsivantes apresentem efeitos colaterais, tais como sonolência, tontura e fadiga muscular (JENSEN, 2002; DICKENSON et al., 2002; TURK et al 2011). Nos casos de DMS, o bloqueio simpático (simpatectomia) tem sido considerado o melhor

tratamento para a dor neuropática, apesar de a sua eficácia ser discutida (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

Sabe-se que é complexa a relação entre a etiologia, a síndrome neuropática e a eficácia do tratamento, pois alguns pacientes com lesão de nervo não desenvolvem dor neuropática, enquanto que em outros ocorre dor acentuada e de longa duração após lesão de nervo periférico ou central (ZIMMERMANN, 2001). Diante deste contexto, como a maioria das drogas utilizadas possui normalmente efeitos muito mais paliativos do que curativos o emprego de terapias combinadas vem sendo preconizado para se obter um melhor resultado, utilizando doses cada vez menores, a fim de reduzir os efeitos colaterais. Por isso, existe na atualidade uma grande necessidade do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que possam ser úteis no tratamento da dor neuropática.

### 3.3 Canais Iônicos de Potencial Transitório

A história dos receptores de potencial transitório (TRP) teve início na década de 1960, quando COSENS e MANNING (1969) descreveram pela primeira vez a existência de uma variante mutante de *Drosophila melanogaster* que se apresentava cega. Baseado neste propósito, MINKE (1977) estudando fotoreceptores de moscas do gênero *Drosophila* identificou uma mutação neste inseto que resultava em uma corrente transitória em resposta à luz, em contraste à corrente sustentada da *Drosophila* não mutante. Análises futuras mostraram que esses animais possuíam uma mutação em um canal de entrada de cálcio, mais tarde denominado receptor de potencial transitório (TRP) (MINKE 2010).

Os receptores TRP, constituem uma família de canais iônicos com a capacidade de permear cátions, principalmente cálcio. Localizados nos terminais periféricos dos nociceptores e responsáveis pela detecção do estímulo nocivo, uma vez que sua ativação contribui para a geração do potencial de ação necessário para transmissão da informação nociceptiva. Além disso, estes receptores possuem a capacidade de detectar temperaturas frias ou quentes, particularmente temperaturas nocivas (abaixo de 17 °C ou acima de 43 °C), sendo a maioria ainda ativado por substâncias naturais e ligantes endógenos como produtos de peroxidação lipídica e outras espécies reativas de oxigênio (MAPHERSON et al., 2005; TOMINAGA, 2007).

Com base na seqüência homóloga dos aminoácidos, a família TRP pode ser dividida em sete superfamílias principais: TRPC (família TRP Canônica), TRPM (família TRP Melastatina), TRPV (família TRP Vanilóide), TRPP (família Policistina), TRPML (família Mucolipina), TRPN (família "NOMPC" ou nenhum mecanoreceptor C potencial) e TRPA (família TRP com domínios repetidos relacionados à Anquirina) (PEDERSEN et al., 2005).

Todos os canais TRP são subunidades polipeptídicas com seis domínios transmembrana que normalmente se unem como tetrâmeros para formar poros. Os poros se localizam entre os domínios transmembranares cinco e seis e são permeáveis a cátions de maneira não seletiva e a região sensor de voltagem entre as regiões um e quatro (LATORRE et al, 2009; CLAPHAM, 2003; MONTELL, 2003). A cauda C e N terminal apresentam-se voltadas para o lado intracelular, com caráter fortemente hidrofóbico (GAUDET, 2009). A região N terminal apresenta-se formada por uma série de resíduos de anquirina, presente na maioria dos canais TRP. Estes resíduos formam uma superfície estável proporcionando o acoplamento de diversas proteínas ao receptor, assim alterações nesta região causam uma deficiência na sua funcionalidade (MONTELL et al., 2005; LEVINE e ALESSANDRI-HABER, 2007).

A família de canais iônicos TRP contribui para mudanças na concentração intracelular de cálcio, pois promove vias de entrada de cálcio, além de modular a força de direção para a entrada de cálcio e provavelmente também por prover vias intracelulares para liberação deste íon de organelas celulares. Estas propriedades são importantes, pois alterações na concentração de cálcio citosólico livre desempenham um papel central em muitos processos celulares incluindo a contração muscular, a liberação de transmissores, proliferação celular, transcrição de genes e morte celular (PEDERSEN et al., 2005).

Atualmente, após 10 anos da publicação da clonagem do canal TRPV1 vários canais TRP, como TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 e TRPM8 têm sido descritos como expressos em nociceptores aferentes primários. São canais que estão emergindo como transdutores sensoriais podendo participar na geração de sensações de dor evocada por estímulos químicos, térmicos e mecânicos, sendo aqueles que respondem a mais de um desses estímulos ditos canais polimodais. TRPV1, TRPV3, TRPM8 e TRPA1 são quimiorreceptores, sensíveis respectivamente à capsaicina e endocanabinóides, cânfora, mentol e isotiocianato de alila (do óleo de mostarda) e o cinamaldeído (do óleo da canela), além disso, o TRPV4 e o TRPA1



são também termorreceptores (STORY et al., 2003; LEVINE e ALESSANDRI-HABER, 2007).

A inflamação e a disfunção de nervos periféricos têm sido associados com o aumento da excitabilidade dos nociceptores, resultando em mudanças na sua condutividade iônica. Estudos recentes com camundongos nocautes para vários TRPs indicam que estes canais iônicos podem desempenhar um papel crucial na hipersensibilidade térmica assim como química e mecânica, características que estão associadas tanto a inflamação periférica quanto à neuropatias (LEVINE e ALESSANDRI-HABER, 2007).

Assim, considerando as diversas etiologias e mecanismos moleculares dessas síndromes dolorosas, é de grande importância o desenvolvimento de novas terapias, dessa forma muitas moléculas de transdução da nocicepção foram identificadas sendo a família dos receptores de potencial transitório (TRP) o maior grupo de detectores de estímulos nocivos (CHENG, JI, 2008; PATAPOUTIAN et al., 2009).

### **3.3.1 Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1)**

O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), chamado anteriormente de ANKTM1, foi inicialmente identificado como uma proteína que é perdida depois da transformação oncogênica de fibroblastos humanos (JAQUEMAR et al., 1999). Estruturalmente, o receptor TRPA1 é uma proteína com seis domínios transmembrana, com ambas as porções amino e carboxi terminal intracelulares, sendo que o longo domínio citoplasmático N-terminal possui múltiplos domínios relacionados à proteína anquirina e resíduos de cisteína identificados como locais cruciais para as ligações covalentes do receptor TRPA1 (para revisão ver JAQUEMAR et al., 1999; MACPHERSON et al., 2007; CAMINO et al., 2010).

Além de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), o receptor TRPA1 é expresso em neurônios do gânglio do nervo trigêmeo (TG) e do gânglio nodoso (STORY et al., 2003; NAGATA et al., 2005). Também é encontrado fora do SNC em tecidos não neuronais como no folículo capilar, algumas áreas do intestino, músculo esquelético, coração, cérebro e componentes do sistema imune onde parece agir

como um canal sensível a estímulos mecânicos (COREY et al., 2004; KARASHIMA et al., 2009).

Estudos quantitativos realizados com camundongos adultos demonstraram que o TRPA1 é expresso em 56% dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, 36% dos neurônios do gânglio do nervo trigêmeo e 28% dos neurônios do gânglio nodoso (NAGATA et al., 2005). O receptor TRPA1 não é expresso em neurônios altamente mielinizados, mas está presente em neurônios que contêm o CGRP e a substância P, sugerindo sua expressão por fibras A $\delta$  e C sensíveis à estimulação nociva. Assim, pode-se dizer que o TRPA1 é seletivamente expresso pelo subconjunto de fibras sensoriais peptidérgicas positivas para isolectina 4 (IB4) no gânglio da raiz dorsal que também expressam TRPV1, implicando assim seu possível papel no processamento da dor (STORY et al., 2003; CASPANI et al., 2007; ANDRADE et al., 2008). Além dos neurônios sensoriais, o RNAm codificador da proteína que compõe o TRPA1 é encontrado em neurônios simpáticos do gânglio cervical superior de camundongos (SMITH et al., 2004).

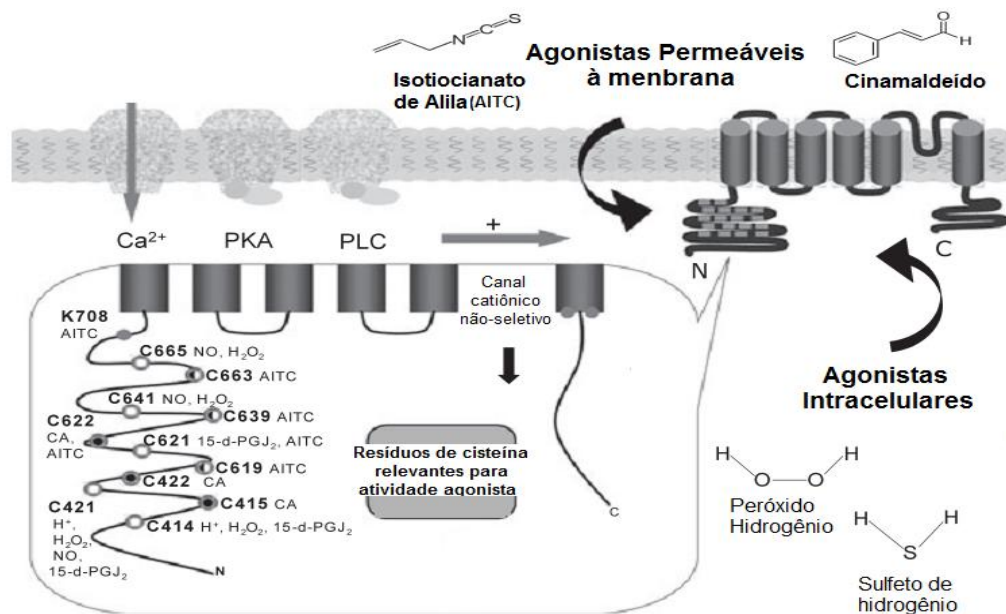
O TRPA1 é um canal não-seletivo permeável ao cálcio, foi caracterizado como sendo um termoreceptor expresso em subgrupos de neurônios sensoriais ativado pelo frio nocivo, aproximadamente 17 °C (STORY et al., 2003; CALIXTO et al., 2005; PATAPOUTIAN et al., 2009). Recentes descobertas utilizando camundongos nocautes para o receptor TRPA1 mostraram que esse receptor está implicado nos processos de nocicepção, tanto agudo como crônicos induzido pelo frio nocivo (OBATA et al., 2005; BAUTISTA et al., 2006). Além disso, o tratamento com o antisense do TRPA1 reduziu os comportamentos de hipersensibilidade ao frio, após a inflamação induzida por CFA (Adjuvante completo de Freund) ou lesão do nervo ciático (LEVINE et al., 2007).

As correntes provocadas pelo decréscimo da temperatura em células CHO (células de ovário do hamster chinês) ou ovócitos de *Xenopus* expressando o TRPA1 apresentaram marcada dessensibilização e sensibilidade ao vermelho de rutênio, um bloqueador não seletivo de canais TRP. Estes resultados indicaram que o TRPA1 é um canal catiônico não seletivo com características similares a muitos canais TRP descritos previamente (STORY et al., 2003). Assim, a estimulação pelo frio do TRPA1 aumenta a concentração de cálcio intracelular com uma temperatura de ativação menor do que aquela requerida para ativar o canal TRPM8. Em adição, o receptor TRPA1 pode ser ativado pela bradicinina através do receptor B<sub>2</sub>

(BANDELL et al., 2004). A interação entre receptores metabotrópicos e canais iônicos TRP pode ser mediada por substâncias produzidas pela ativação da fosfolipase C ou fosfolipase A<sub>2</sub> (CLAPHAM, 2003).

Esses receptores também podem ser ativados por substâncias pungentes incluindo compostos presentes nos óleos de mostarda ou wasabi (isotiocianato de alila), canela (cinamaldeído), alho (alicina), maconha ( $\Delta$ 9-tetraidrocanabinol), irritantes ambientais (fumaça de cigarro), espécies reativas do oxigênio (peróxido de hidrogênio), mediadores endógenos (sulfeto de hidrogênio), prostaglandinas (PGJ<sub>2</sub>) e aldeídos reativos (4-hidroxinonenal) (LEVINE et al., 2007; MCNAMARA et al., 2007; BODKIN E BRAIN 2010; CAMINO et al., 2010; TREVISANI et al., 2007).

Agonistas endógenos tendem a estar relacionados com estresse oxidativo (ANDERSSON et al., 2008). Os agonistas TRPA1 melhor identificados agem via modificações covalentes nos resíduos de cisteína na porção N-terminal do canal (ver figura 1).



**Figura 1:** Ativação do receptor TRPA1 por alguns agonistas, via modificação de cisteínas. Ca<sup>2+</sup>, cálcio; PKA, proteína quinase A; PLC, fosfolipase C; AITC, isotiocianato de alila; CA, cinamaldeído; NO, óxido nítrico; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio; H<sup>+</sup>, íon hidrogênio; PGJ<sub>2</sub>, prostaglandina (Adaptado de Bodkin e Brain 2010).

Tem sido demonstrado que o receptor TRPA1 pode ser útil na transmissão nociceptiva. Vários estudos indicam que esse receptor desempenha um importante papel na alodínia mecânica e ao frio na neuropatia causada por diabetes, trauma e

quimioterapia (OBATA et al. 2005; EID et al. 2008; STAAF et al. 2009; BARRIÈRE et al., 2011). Além disso, sabe-se que algumas espécies reativas de oxigênio e aldeídos gerados a partir do metabolismo da NE estão envolvidas na manutenção da dor neuropática (Dina et al., 2008). No entanto, o papel do TRPA1 na dor neuropática mediado pelo sistema nervoso simpático é desconhecida. Assim, investigamos um possível envolvimento do receptor TRPA1 em um modelo de neuropatia mantido pelo simpático em camundongos.

---

#### **4. ARTIGO**

Artigo submetido à revista The Journal of Pain

## The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain

**Running title:** TRPA1 receptor on sympathetically-maintained pain

Francielle de Vargas Pinheiro<sup>a</sup>, Jardel Gomes Villarinho<sup>a</sup>, Cássia Regina da Silva<sup>b</sup>, Sara Marchesan de Oliveira<sup>b</sup>, Kelly de Vargas Pinheiro<sup>a</sup>, Delia Petri<sup>c</sup>, Mateus Fortes Rossato<sup>b</sup>, Gustavo Petri Guerra<sup>a</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a</sup>, Pierangelo Geppetti<sup>d</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,b,\*</sup>, Eunice André<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Pharmacology, <sup>b</sup>Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

<sup>d</sup>Department of Preclinical and Clinical Pharmacology, University of Florence, Florence, Italy.

<sup>e</sup>Department of Biophysics and Pharmacology and Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

\*Corresponding author:

Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Camobi, Zip code: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: + 55 55 3220 8053, Fax: +55 55 3220 8978, email: ferreiraj99@gmail.com

**ABSTRACT**

Some forms of neuropathic pain are maintained by sympathetic fibers, but the underlying mechanisms are poorly understood. Thus, the aim of this study was to investigate the possible involvement of the TRPA1 receptor as well as the role of the sympathetic nervous system (involved in sympathetically maintained neuropathic pain) in a model of neuropathic pain induced by chronic sciatic nerve constriction injury (CCI) in mice. The systemic injection of the selective TRPA1 antagonist HC-030031 reversed both mechanical and cold allodynia induced by chronic sciatic nerve constriction injury. Nerve injury also sensitizes mice to the nociception induced by the intraplantar injection of a low dose of the TRPA1 agonist allyl isothiocyanate without changing TRPA1 immunoreactivity in the injected paw. Furthermore, the chemical sympathectomy produced by guanethidine largely prevented CCI-induced mechanical and cold allodynia. CCI also induced a norepinephrine-triggered nociception that was inhibited by  $\alpha$ -adrenoceptor antagonism and norepinephrine transporter and monoamine oxidase inhibition. Finally, the peripheral injection of HC-030031 also largely reduced CCI-induced nociception by norepinephrine and mechanical or cold allodynia. Taken together, the present findings reveal the critical role of TRPA1 in mechanical and cold hypersensitivity as well as in hypersensitivity to norepinephrine following nerve injury.

**Perspective:** This article presents the role of TRPA1 receptor on the sympathetically-maintained nociception induced by nerve injury in mice. Our results suggest that TRPA1 antagonists may be useful to treat neuropathic patients that present sympathetically maintained pain.

**Key words:** chronic constriction injury; TRPA1 antagonist; norepinephrine; adrenoceptor; cold allodynia; mechanical allodynia.

## 1. INTRODUCTION

Neuropathic pain is a debilitating condition that is poorly understood, often untreatable and caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system<sup>32</sup>. Pain after neuropathy is the consequence of a complex interplay of mechanisms in the peripheral and central nervous system and is often resistant to common therapeutic interventions that are among the most intractable of pain syndromes<sup>35</sup>. A common complaint of neuropathic pain patients is spontaneous pain and painful hypersensitivity to mechanical, thermal and chemical noxious (hyperalgesia) or innocuous (allodynia) stimuli<sup>12</sup>. The sympathetic nervous system may mediate some forms of neuropathic pain, such as when pain relief is achieved by sympathetic blockade or antagonism of  $\alpha$ -adrenoceptor<sup>6</sup>. Moreover, some neuropathies cause hypersensitivity to norepinephrine that may stimulate nociceptors and induce spontaneous pain<sup>1,17,31,36</sup>. However, the mechanisms involved in sympathetically maintained neuropathic pain are poorly understood.

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective, calcium-permeable cation channel usually expressed in a subset of small diameter primary afferent nerve fibers<sup>30,26</sup>. TRPA1 has been demonstrated to be relevant for the detection of nociceptive stimuli and may be activated by various exogenous irritants, such as allyl isothiocyanate from mustard oil<sup>23</sup> and several endogenous reactive species, such as hydrogen peroxide and unsaturated aldehydes from oxidative stress<sup>2,33</sup>. Furthermore, it has been demonstrated that TRPA1 may be important to cold and mechanical neuropathic allodynia caused by trauma, diabetes and chemotherapy<sup>12,18,23,25</sup>. It has been suggested that some reactive oxygen species



and reactive aldehydes generated from norepinephrine uptake and metabolism are involved in neuropathic pain maintenance<sup>15</sup>.

However, the influence of TRPA1 on neuropathic pain as mediated by the sympathetic nervous system is currently unknown. Thus, the aim of this study was to investigate the possible involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically mediated neuropathic pain.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals

Experiments were conducted using male adult Swiss mice weighing 25-35 g bred in Federal University of Santa Maria animal house, which were maintained in home cages under a 12:12 h light-dark cycle (lights on 06:00 h) and at constant room temperature ( $22 \pm 2$  °C). The animals were acclimatized in the laboratory for at least 2 hours before testing. The experiments were performed with the agreement of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number: 164/2011) and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations involving experiments on conscious animals<sup>37</sup>. The number of animals and the nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. Animal allocation to treatment groups was randomized by computer with the use of Research Randomizer ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)). Blinded investigators carried out the behavioral observations.

### 2.2 Drugs and reagents

Allyl isothiocyanate, norepinephrine, propranolol, phentolamine, desipramine, guanethidine and clorgyline hydrochloride were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). HC-030031 (2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl) acetamide) was synthesized as previously described<sup>4</sup>. Acetone was also used and purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Allyl isothiocyanate, HC-030031 and propranolol stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, 5%), Tween-80 (10%) and phosphate-

buffered saline (PBS, 137 mM NaCl and 10 mM phosphate buffer, pH 7.4). The stock solutions of the other drugs were prepared in PBS. All stock solutions were diluted to the desired concentration just before use in PBS. For the actual drug administration, the final concentration of DMSO and Tween-80 did not exceed 0.5% and did not cause any detectable effect *per se*.

### **2.3 Neuropathic pain model**

For induction of chronic mononeuropathy, mice were first anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride. Neuropathy was induced by the chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve using a similar procedure to that previously described for rats<sup>7</sup> and adapted for mice<sup>29</sup>. Three loosely constrictive ligatures were placed around the right sciatic nerve under anesthesia. In sham surgery, animals were anesthetized and the sciatic nerve was exposed without performing constriction. Sham-operated animals were used as neuropathy controls. Naive animals were neither anesthetized nor operated upon. They were used as surgery controls. The nociceptive tests were carried out seven days after the procedures.

### **2.4. Measurement of mechanical allodynia**

We utilized mechanical allodynia as one parameter of nociception, which was characterized by a significant decrease in the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) when compared to baseline values. The measurement of mechanical PWT was carried out using the up-and-down protocol as described previously<sup>12</sup>. Briefly, mice were first acclimatized in individual clear Plexiglas boxes (9 x 7 x 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the right hind

paw. Next, von Frey filaments of increasing stiffnesses (0.02-10 g) were applied to the hind paw plantar surfaces with enough pressure to bend the filament. The absence of paw lifting after 5 s led to the use of the next stiffer filament, whereas paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weaker filament. This protocol continued until a total of six measurements were taken or four consecutive positive or negative responses occurred. All measurements were carried out in the paw ipsilateral to the surgical or sham procedure. The 50% mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores as described previously<sup>16</sup>. The 50% PWT was expressed in grams (g) and was evaluated before (baseline) and several times after treatments or surgical procedures.

### ***2.5 Measurement of cold allodynia***

We utilized cold allodynia as another nociception parameter, which was characterized by a nocifensive reaction of animals after evaporative cooling of topically applied acetone<sup>12</sup>. After the measurement of PWT, 20  $\mu$ l of acetone was applied to the dorsal hind paw ipsilateral to the injury, and the resulting behavior was assigned an arbitrary score. A score of 0 indicated no response, 0.5 a licking response, 1 flinching and brushing of the paw, 2 strong flinching, and 3 strong flinching and licking. Mouse behavior was observed during the first 30 seconds before (baseline) acetone application, after acetone application and several times after the treatments or surgical procedures.

### ***2.6. Role of the TRPA1 receptor on neuropathic nociception induced by CCI***

We verified the role of the TRPA1 receptor on CCI-induced neuropathic nociception by investigating the possible antinociceptive or nociceptive effects of a

TRPA1 receptor antagonist and agonist. In addition, we investigated the alteration of TRPA1 immunoreactivity in control or nerve-injured mice.

### *2.6.1 Effect of selective TRPA1 antagonist treatment on CCI-induced mechanical and cold allodynia*

The involvement of TRPA1 in CCI-induced allodynia was evaluated using the selective TRPA1 antagonist HC-030031. Seven days after surgery, the mice were treated with HC-030031 (10, 30 or 100 mg/kg) or vehicle (0.25% DMSO, 0.5% Tween-80 in PBS) via the intraperitoneal (i.p.) route. The effect of the drug on mechanical and cold allodynia was examined one hour before treatment and at different time points after (0.5-4 hours) the i.p. HC-030031 treatment. Separate groups of animals were treated with HC-030031 (100 µg/paw) or vehicle (20 µl/paw) via subcutaneous injection under the dorsal surface of the right hind paw (intraplantar, i.pl.), and the effect of the drug on mechanical and cold allodynia was examined before and 1 hour after treatment.

### *2.6.2 TRPA1 agonist-induced spontaneous nociception*

We next investigated if a low dose of a TRPA1 agonist could induce spontaneous nociception in nerve-injured mice. Spontaneous nociception induced by the TRPA1 receptor agonist allyl isothiocyanate was carried out as previously described<sup>3</sup>. The animals were placed individually in chambers (transparent glass cylinders 20 cm in diameter) and were allowed to adapt to the chambers for 10 min before treatment. After the adaptation period, 20 µl of a sub-effective dose of allyl isothiocyanate (100 ng/paw<sup>3</sup>) was intraplantarly injected into the right hind paw. Separate groups of animals received an i.pl injection of the appropriate vehicle and

were used as controls. After challenge, mice were observed individually for 5 min, and the amount of time spent licking, flinching or lifting the injected paw was measured with a chronometer and was considered indicative of nociception. A separate group of animals was also treated with HC-030031 (100 mg/kg) or vehicle via the intraperitoneal route 1 hour before allyl isothiocyanate injection.

### 2.6.3 TRPA1 immunoreactivity analysis

Immunoreactivity to the TRPA1 receptor was assessed by western blot analysis as previously described<sup>19</sup> with minor modifications. The right hind paw skin (the site of nociceptive measures) and the sciatic nerve (the site of nerve injury) were quickly isolated and homogenized in a lysis buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM NaF, 10 µg/mL aprotinin, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 mM DL-dithiothreitol (DTT) and 2 mM of sodium orthovanadate. After centrifugation (3,000 x g for 30 minutes at 4 °C), the supernatant was collected. The protein content was determined by the method of Comassie Dye<sup>8</sup>, using bovine serum albumin as a standard. Next, 50 and 30 µg of protein from the sciatic nerve and hind paw, respectively, were mixed in loading buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 10 minutes. The proteins were separated in 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels (SDS–PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, USA). The membranes were incubated with Ponceau stain, which served as a loading control<sup>10</sup>. After staining, the membranes were dried, scanned and quantified with Scion Image for Windows (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). The 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 minutes with a specific rabbit polyclonal IgG antibody to anti-TRPA1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:150 in TBS-T. The blots were washed three times with TBS-T followed by incubation with alkaline phosphatase-coupled secondary antibody (1:3000) for 10 minutes. The protein bands were visualized with a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium system (BCIP/NBT, Millipore). The membranes were dried, scanned and quantified with the Scion Image PC version of the Macintosh-compatible NIH image software. The TRPA1 western blot presented a faint background that was corrected during the image analysis.

## ***2.7 Role of sympathetic nervous system on CCI-induced neuropathic nociception***

We investigated the role of the sympathetic nervous system on CCI-induced neuropathic nociception by investigating the effect of chemical sympathectomy on the allodynia caused by CCI and the possible nociceptive effect of norepinephrine in control and nerve-injured mice.

### ***2.7.1 The role of sympathetic fibers in CCI-induced nociception***

To investigate the role of sympathetic fibers in CCI-induced nociception, a chemical sympathectomy was produced by the treatment of mice with guanethidine (30 mg/kg, i.p.) 3 days before CCI challenge, as described previously<sup>19</sup>. Seven days after treatment, lesions and mechanical and cold allodynia were measured as described above.

### *2.7.2 Norepinephrine-induced spontaneous nociception*

Spontaneous nociception induced by norepinephrine was carried out as previously described<sup>36</sup> with minor modifications. Seven days after sham or nerve-injury surgery, the animals were placed individually in chambers (transparent glass cylinders 20 cm in diameter) and were allowed ten minutes for adaption before treatment. After the adaptation period, 20  $\mu$ l of the adrenergic receptor agonist norepinephrine (30 ng/paw) was intraplantarly injected under the dorsal surface of the right hind paw. Separate groups of animals received an i.pl. injection of the appropriate vehicle and were used as controls. After challenge, the mice were observed individually for 5 minutes, and the amount of time spent licking, flinching or lifting the injected paw was measured with a chronometer and considered indicative of nociception.

### ***2.8 Investigation of some mechanisms involved in norepinephrine-induced nociception in nerve-injured mice***

To investigate some of the possible mechanisms through which peripheral injection of norepinephrine causes nociception in nerve-injured mice, distinct groups of animals were treated with different classes of drugs, all locally co-administered with norepinephrine (30 ng/paw, i.pl.). The following drugs were co-administered with norepinephrine: the  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist phentolamine (100 ng/paw), the  $\beta$ -adrenoceptor antagonist propranolol (300  $\mu$ g/paw), the norepinephrine transporter (NET) inhibitor desipramine (100 ng/paw), the monoamine oxidase-A inhibitor (MAO-A) clorgyline (100 ng/paw) and the TRPA1 receptor antagonist HC-030031 (100  $\mu$ g/paw). A separate group of animals was also treated with HC-030031 (100 mg/kg) or vehicle via the intraperitoneal route 1 hour before norepinephrine injection. The



dosage choice for each drug was based on previous data described in the literature<sup>36,19,13,17</sup> or on preliminary experiments carried out in our laboratory.

## **2.9 Statistical analyses**

The results are presented as the means  $\pm$  SEM, except for the cold allodynia scores, which were reported as medians followed by their 25th and 75th percentiles. The inhibition percentages are reported as the mean  $\pm$  S.E.M. and were calculated based on responses of the control group. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 4.0 software. The significance of differences among groups was evaluated with Mann Whitney's test or a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (for the cold allodynia results) along with an unpaired Student's t-test and one-way analysis of variance (ANOVA). The ANOVA was followed by a Student-Newman-Keuls' (SNK) test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's test (for mechanical allodynia and spontaneous nociception results).  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. RESULTS

#### ***3.1 Antinociceptive effect of the selective TRPA1 antagonist HC-030031 on CCI-induced mechanical allodynia***

Figure 1A depicts the paw withdrawal thresholds 50% (PWT) of naïve, sham, and nerve-injured mice. There was no difference in the PWT values among the groups before the procedure or between naïve and sham-operated mice 7 days after the procedure. On the other hand, chronic constriction injury of the sciatic nerve induced a marked mechanical allodynia when compared with sham surgery in mice 7 days after lesion creation (Figure 1A).

The mechanical allodynia produced by nerve injury was maintained throughout the experimental period in vehicle-treated mice (Figure 1B). However, the systemic injection of HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) reversed CCI-induced mechanical allodynia from 0.5 to 2 hours after injection, with a complete inhibition 1 hour after treatment (Figure 1B). The higher dose (100 mg/kg) but not the lower doses (10 and 30 mg/kg, i.p.) of injected HC-030031 was capable of reducing mechanical allodynia in nerve-injured mice (Figure 1C). Of note, the HC-030031 treatment (100 mg/kg, i.p.) was not able to alter the mechanical thresholds of sham-operated mice (results not shown). Thus, the 100 mg/kg (i.p.) HC-030031 dose was used in the later tests.

#### ***3.2 Antinociceptive effect of the selective TRPA1 antagonist HC-030031 on CCI-induced cold allodynia***

Figure 2A depicts the nocifensive reaction of the right hind paw of animals after evaporative cooling of acetone. The topical application of acetone did not

induce nociception in naive, sham, and nerve-injured mice before the procedure (baseline) or in naive or sham animals seven days after the surgical procedure. In contrast, chronic constriction injury of the sciatic nerve induced cold allodynia when compared to sham surgery in mice seven days after lesion creation (Figure 2A).

The systemic treatment with HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) almost completely reversed the cold allodynia induced by CCI compared to the vehicle group at 1 h and 2 h after administration (Figure 2B). The treatment with HC-030031 did not alter the acetone scores in sham-operated animals (results not shown).

### **3.3 TRPA1 agonist-induced nociception in neuropathic mice**

The sensitivity of peripheral TRPA1 receptors in neuropathic mice was investigated by examining the spontaneous nociception induced by a receptor agonist (Figure 3). The intraplantar injection of a low dose of the TRPA1 agonist allyl isothiocyanate (AITC, 100 ng/paw) did not induce nociception in sham-operated mice but did cause an intense nociceptive response in mice seven days after CCI (Figure 3A). Furthermore, it was observed that pre-treatment with HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) was able to largely prevent (inhibition of  $91\pm 2\%$ ) the spontaneous nociception induced by AITC in nerve-injured mice (Figure 3B).

### **3.4 Detection of TRPA1 immunoreactivity in neuropathic mice**

We next investigated whether the nociceptive response to the TRPA1 agonist could be due to an increase in expression of TRPA1 in the right hind paw (local nociception measurement) or sciatic nerves (local nerve injury). We observed that TRPA1 immunoreactivity in the hind paw ipsilateral to the nerve lesion was no different between the sham and nerve-injured mice (Figure 3C). However, CCI was

capable of significantly reducing ( $44\pm 10\%$ ) TRPA1 immunoreactivity in the sciatic nerve seven days after lesion creation compared to the sham-operated group (Fig. 3D).

### **3.5 CCI-induced nociception is sympathetically maintained**

The chemical sympathectomy produced by guanethidine (30 mg/kg, i.p., 3 days before) largely prevented CCI-induced mechanical (Figure 4A) and cold allodynia (Figure 4B), and the mechanical threshold and acetone scores similar to baseline values (before the surgical procedure). The same guanethidine treatment did not alter either the mechanical thresholds or acetone scores in sham-operated mice (results not shown).

Next, we investigated if nerve-injured animals had a nociceptive response to norepinephrine. The intraplantar injection of norepinephrine (30 ng/paw) only induced a few spontaneous nociceptive behaviors in sham-operated animals ( $8.0\pm 3.2$  s of response), which were no different than the responses to vehicle (PBS) in sham or nerve-injured mice ( $5.1\pm 2.0$  and  $4.4\pm 2.3$  s of response, respectively) (Figure 4C). In contrast, the intraplantar injection of norepinephrine (30 ng/paw) produced a marked nociceptive response in animals seven days after CCI when compared with the PBS group ( $39.3\pm 7.1$  and  $8.0\pm 3.2$  s of response, respectively) (Figure 4C).

### **3.6 Study of the peripheral mechanisms involved in NE-induced nociception**

First, we considered the role of adrenoceptors, norepinephrine uptake and degradation on norepinephrine-induced nociception by using receptor antagonists, transporter and enzyme inhibitors. The co-administration of the  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist phentolamine (100 ng/paw), but not the  $\beta$ -adrenoceptor antagonist

propranolol (300 pg/paw), was capable of only somewhat, but still significantly, inhibiting ( $24\pm 7\%$ ) NE-induced nociception (30 ng/paw) (Figure 5A and B). Furthermore, co-administration with the selective norepinephrine transporter inhibitor desipramine (100 ng/paw) or the selective monoamine oxidase inhibitor clorgyline (100 ng/paw) largely reduced (inhibition of  $88\pm 3\%$  and  $90\pm 7\%$ , respectively) the nociception caused by NE (30 ng/paw) in neuropathic mice (Figure 5C and D).

### ***3.7 Effect of the TRPA1 antagonist in NE-induced nociception, cold and mechanical allodynia caused by nerve injury***

The systemic (100 mg/kg, i.p.) or local (100  $\mu$ g/paw, i.pl.) injection of HC-030031 largely reduced (inhibition of  $81\pm 9$  and  $63\pm 8\%$ , respectively) NE-induced nociception (30 ng/paw) in nerve-injured animals (Figure 6A and B). Finally, the peripheral injection of HC-030031 (100  $\mu$ g/paw, intraplantar) was also able to almost completely abolish the mechanical and cold allodynia induced by nerve injury (Figure 6C and D).

## **4. DISCUSSION**

Neuropathic pain is among the most intractable of pain syndromes<sup>35</sup>. Thus, the study of its mechanisms is relevant to the development of more effective treatments for neuropathic pain. Sympathetic nervous system activation and TRPA1 stimulation seem to be important underlying mechanisms of some neuropathic pain syndromes, but the relationship between them is unknown. In the present study, we observed TRPA1 receptor-mediated nociception in a model of sympathetically maintained pain in mice.

We observed that a selective TRPA1 antagonist largely reversed both mechanical and cold allodynia induced by chronic sciatic nerve constriction injury in mice. Our results are in accordance with the literature, which indicates that TRPA1 antagonists or antisense oligonucleotides may reduce mechanical and cold allodynia produced in rodents by spinal nerve ligation, nerve injury, streptozotocin and oxaliplatin<sup>14,18,23,25,34</sup>. Taken together, these findings demonstrate the critical role of the TRPA1 receptor in pain symptoms related to the neuropathy of different etiologies.

We also investigated the sensitivity of peripheral TRPA1 receptors in neuropathic mice. We observed that the intraplantar injection of the TRPA1 agonist allyl isothiocyanate (the main component of mustard oil) at a dose where it did not produce spontaneous nociception in sham-operated mice<sup>11</sup> caused an intense nociceptive response in mice with chronic sciatic nerve constriction injury. Of note, it was already observed a similar nociceptive hypersensitivity to topically applied mustard oil in paws ipsilateral to CCI in rats<sup>7</sup>. Moreover, we observed that the treatment with HC-030031 abolished allyl isothiocyanate-induced nociception, indicating that this response was mediated by the TRPA1 receptor. Although CCI induced a peripheral sensitization to TRPA1 agonists, we were unable to detect any difference in the TRPA1 immunoreactivity of the stimulated hind paw between sham and operated mice. Thus, the nociceptive response to TRPA1 agonist was not due to an increase in tissue TRPA1 content, but it could be related to an increase in TRPA1 function. However, additional studies must be carried out to clarify how this exactly occurs. Different from the paw results, we observed a significant reduction of TRPA1 immunoreactivity in the sciatic nerve of constriction-injured mice. Similarly, it was already reported a decrease of TRPA1 mRNA and protein in the dorsal root ganglion

ipsilateral to a chronic constriction injury in mice<sup>12</sup>. These results suggest that cells, other than sensory neurons, are also important for TRPA1 expression in paw skin tissue. In fact, it has been demonstrated that dermal fibroblasts, keratinocytes and even sympathetic neurons express functional TRPA1 receptors that could be involved in pain sensitization<sup>5,20,28</sup>.

Some forms of painful peripheral neuropathy are mediated by the sympathetic nervous system, where pain relief is achieved by sympatholytic procedures<sup>6</sup>. Similar to what has been observed in rats<sup>24</sup>, we detected that the chemical sympathectomy produced by guanethidine largely inhibited the mechanical and cold allodynia observed seven days after CCI in mice, suggesting that CCI is a model for sympathetically maintained pain. Moreover, it has been demonstrated that CCI may induce sympathetic sprouting into the ipsilateral dorsal root ganglion and increase the plasma norepinephrine level of rodents one week after injury<sup>21,27</sup>. In addition to the analgesic effect of sympatholytic procedures, the hypersensitivity to norepinephrine has been taken as evidence for sympathetically maintained pain<sup>36</sup>. In line with the findings demonstrating that norepinephrine may stimulate nociceptors and induce spontaneous pain after nerve injury<sup>1,16,31,36</sup>, we have found that CCI made mice sensitive to norepinephrine-induced spontaneous nociception. Thus, CCI in rodents seems to represent a model of sympathetically maintained pain, at least one week after initial induction.

Next, we investigated the mechanisms involved in the hypersensitivity to norepinephrine after nerve injury, as they are poorly understood. It has been demonstrated that both  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptor are implicated in norepinephrine-induced pain in humans and nociception in rats with neuropathy<sup>16,36</sup>. Accordingly, we verified that the  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist phentolamine, but not the  $\beta$ -adrenoceptor

antagonist propranolol, reduced spontaneous nociception to norepinephrine in constriction-injured mice. As the  $\alpha$ -adrenoceptor antagonism produced a partial effect, other mechanisms are likely involved in such a response. It was been recently demonstrated that norepinephrine uptake and metabolism are involved in alcohol-induced painful peripheral neuropathy in rats<sup>15</sup>. In the same way, treatment with selective inhibitors of the norepinephrine transporter (desipramine) and monoamine oxidase (clorgyline) largely inhibit the nociception caused by NE in nerve-injured mice. Thus, norepinephrine metabolism seems to be an important mechanism underlying the hypersensitivity to norepinephrine after nerve injury.

Norepinephrine metabolism via monoamine oxidase generates some reactive oxygen species and reactive aldehydes, such as hydrogen peroxide 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde, that are neurotoxic<sup>9</sup>. Moreover, these reactive substances have also been suggested to induce nociception<sup>2,15</sup>. As TRPA1 is implicated in mechanical and cold allodynia induced by sciatic nerve injury and is activated by several endogenous reactive species, such as hydrogen peroxide and unsaturated aldehydes from oxidative stress<sup>2,33</sup>, we investigated the role of TRPA1 in hypersensitivity to norepinephrine after nerve injury in mice. Our study results indicate that systemic and peripheral administration of a TRPA1 receptor antagonist almost abolished NE-induced nociception in neuropathic mice. Finally, we have demonstrated that peripheral injection of a TRPA1 receptor antagonist also inhibited both CCI-induced mechanical and cold allodynia in mice. Thus, these data demonstrate the critical role of peripheral TRPA1 to the induction of painful hypersensitivity in a model of sympathetically maintained pain. However, the exact substance(s) produced peripherally to stimulate TRPA1 remain to be elucidated.



Taken together, the present findings reveal the critical role of TRPA1 in mechanical and cold hypersensitivity as well as in hypersensitivity to norepinephrine after nerve injury, suggesting that TRPA1 antagonists may be useful to neuropathic patients that present sympathetically maintained pain.

### **Acknowledgments**

Supported by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular MCT/CNPq and CAPES, Brazil. The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

### **Conflict Of Interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## **5. REFERENCES**

- [1] Ali Z, Raja SN, Wesselmann U, Fuchs PN, Meyer RA, Campbell JN: Intradermal injection of norepinephrine evokes pain in patients with sympathetically maintained pain. *Pain* 88:161-168, 2000.
- [2] Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S: Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28:2485-2494, 2008.
- [3] Andrade EL, Luiz AP, Ferreira J, Calixto JB. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neurosci* 152:511-520, 2008.
- [4] Andre E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D, Creminon C, Vaksman N, Nassini R, Civelli M, Baraldi PG, Poole DP, Bunnett NW,

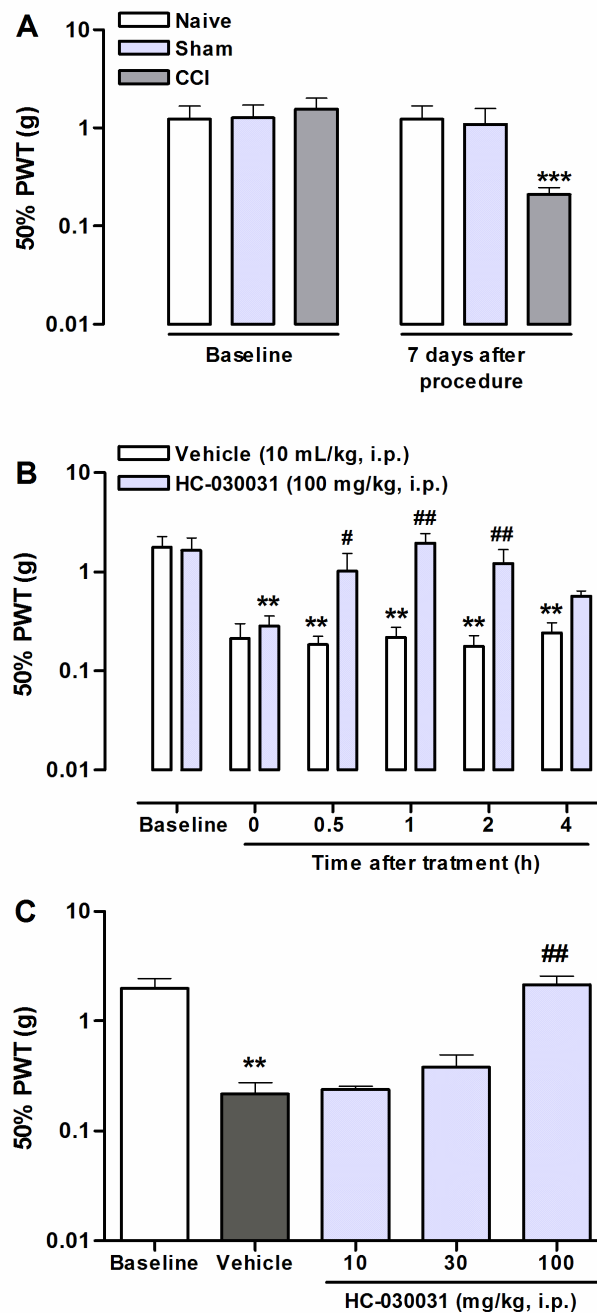
- Geppetti P, Patacchini R: Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest* 118:2574-2582, 2008.
- [5] Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV: Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol* 129:2312-2315, 2009.
- [6] Baron R: Mechanisms of disease: neuropathic pain - a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106, 2006.
- [7] Bennett GJ & Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107, 1988.
- [8] Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
- [9] Burke WJ, Li SW, Chung HD, Ruggiero DA, Kristal BS, Johnson EM, Lampe P, Kumar VB, Franko M, Williams EA, Zahm DS: Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology* 25:101-115, 2004.
- [10] Calvo IR, Ocon B, Moya PM, Suarez MD, Zarzuelo A, Augustin OM, de Medina FS: Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318–320, 2010.
- [11] Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One* 4:e7383, 2009.

- [12] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63, 1994.
- [13] Da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB: The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148:431-743, 2010.
- [14] del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM: TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 30:15165-15174, 2010.
- [15] Dina OA, Khasar SG, Alessandri-Haber N, Bogen O, Chen X, Green PG, Reichling DB, Messing RO, Levine JD: Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 28:1180-1190, 2008.
- [16] Dixon WJ: Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441-462, 1980.
- [17] Drummond PD: Sensory disturbances in complex regional pain syndrome: clinical observations, autonomic interactions, and possible mechanisms. *Pain Med* 11:1257-1266, 2010.
- [18] Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO: HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory and neuropathy induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*; 4:48, 2008.

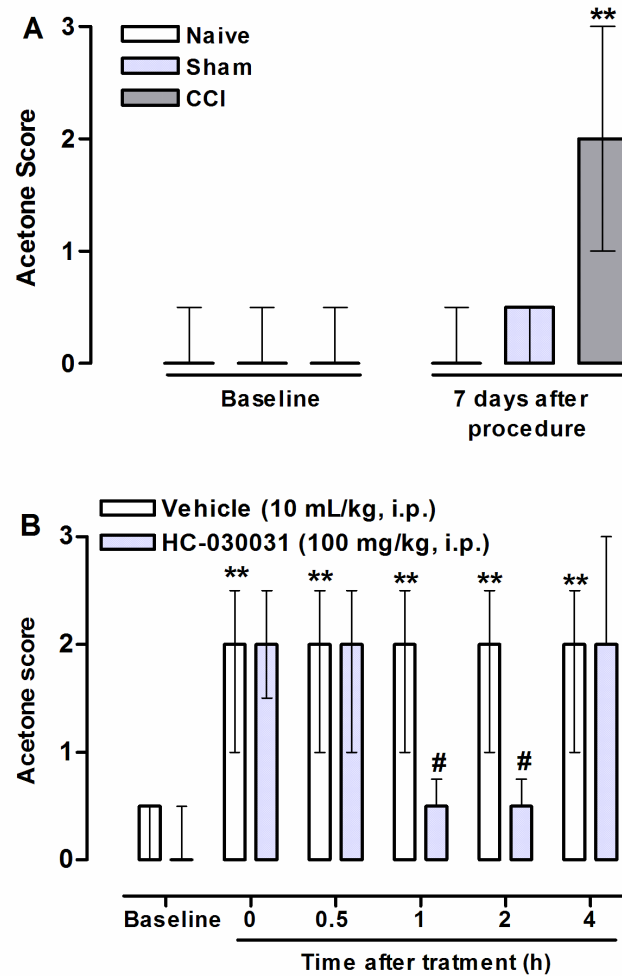
- [19] Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB: Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 117:171-181, 2005.
- [20] Jain A, Brönneke S, Kolbe L, Stäb F, Wenck H, Neufang G. TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns: *Pain* 152:2765-2772, 2011.
- [21] Jin Y, Sato J, Yamazaki M, Omura S, Funakubo M, Senoo S, Aoyama M, Mizumura K: Changes in cardiovascular parameters and plasma norepinephrine level in rats after chronic constriction injury on the sciatic nerve. *Pain* 135:221-231, 2008.
- [22] Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A: Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445:541-545, 2007.
- [23] Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, Failli P, Preti D, Marchetti N, Cavazzini A, Mancini F, Pedretti P, Nilius B, Patacchini R, Geppetti P: Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 152:1621-1631, 2011.
- [24] Neil A, Attal N, Guilbaud G: Effects of guanethidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Res* 565:237-246, 1991.
- [25] Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K: TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115:2393–2401, 2005.

- [26] Pertovaara A, Koivisto A: TRPA1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. *Eur J Pharmacol* 666:1-4, 2011.
- [27] Ramer MS, French GD, Bisby MA: Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* 72:71-78, 1997.
- [28] Smith MP, Beacham D, Ensor E, Koltzenburg M: Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *Neuroreport* 15:1399-1403, 2004.
- [29] Sommer C, Schmidt C, George A: Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 151:138-142, 1998.
- [30] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829, 2003.
- [31] Torebjörk E, Wahren L, Wallin G, Hallin R, Koltzenburg M: Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. *Pain* 63:11-20, 1995.
- [32] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630-1635, 2008.
- [33] Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P: 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13519–13524, 2007.

- [34] Wei H, Hämäläinen MM, Saarnilehto M, Koivisto A, Pertovaara A: Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiol* 111(1):147-154, 2009.
- [35] Woolf CJ, Mannion RJ: Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964, 1999.
- [36] Xanthos DN, Bennett GJ,Coderre TJ: Norepinephrine-induced nociception and vasoconstrictor hypersensitivity in rats with chronic post-ischemia pain. *Pain* 137:640-651, 2008.
- [37] Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.

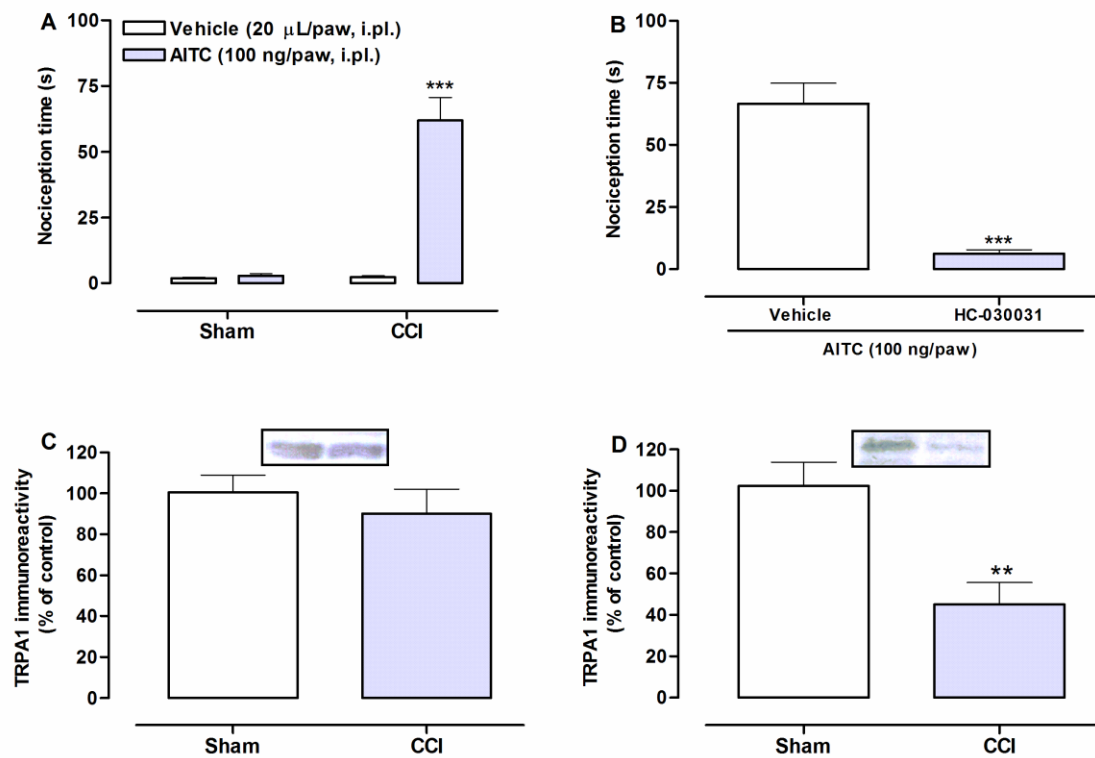


**Figure 1. TRPA1 antagonist reduced neuropathy-induced mechanical allodynia in mice.** A) Fifty percent paw withdrawal thresholds (PWT) before (baseline) and 7 days after procedure in naive, sham and chronic constriction-injured (CCI) mice (n=5-6). \*\*\*P<0.001, compared with sham group (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls' test). B) Time-course of PWT in neuropathic mice treated with HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 mL/kg) (n=5 per group). \*\*P<0.01, compared with baseline values; #P<0.05 and ##P<0.01, compared with vehicle-treated animals (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). C) Dose-response curve for the anti-allodynic effect of HC-030031 (10-100 mg/kg, i.p.) (n=5-7). \*\*P<0.01, compared with baseline, ##P<0.01, compared with vehicle-treated animals (one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls' test). Data are expressed as the means + SEM.

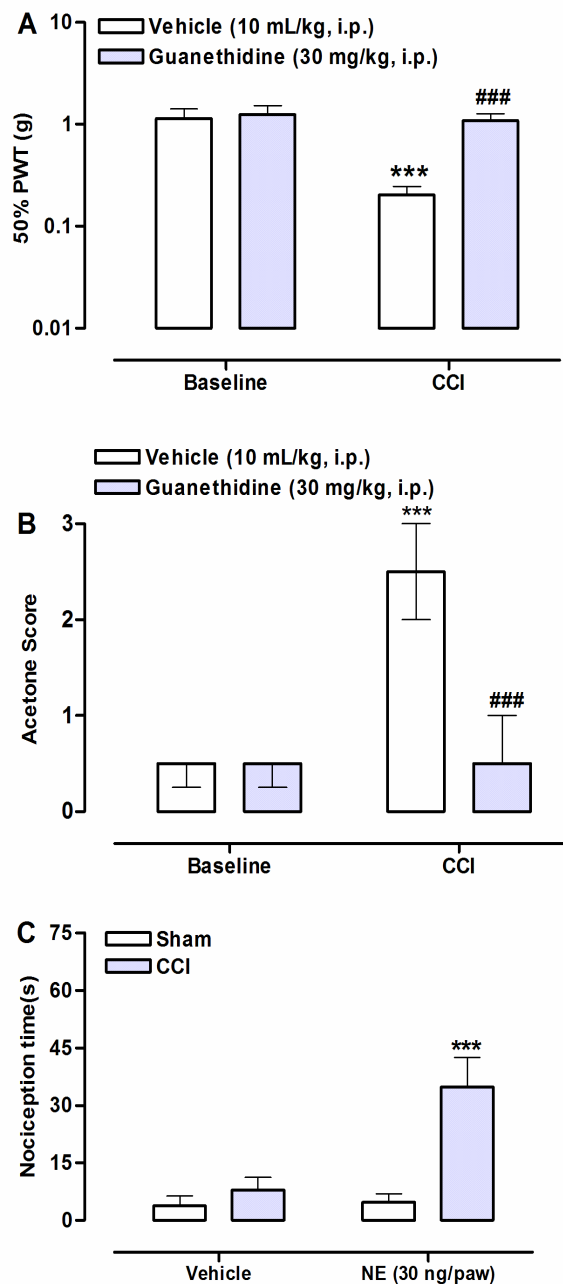


**Figure 2. TRPA1 antagonist reduced neuropathy-induced cold allodynia in mice.** A) Nocifensive reaction scores for the right hind paw of animals after evaporative cooling of acetone before (baseline) and 7 days after the procedure in naive, sham and chronic constriction-injured (CCI) mice (n=5). \*\*P<0.001, compared with sham group (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). B) Time-course of HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) and vehicle (10 mL/kg) effects on cold allodynia in neuropathic mice (n=6 per group). \*\*P<0.01, compared with baseline values; #P<0.05, compared with respective vehicle-treated animals (Mann Whitney's test). Data are expressed as the medians  $\pm$  interquartile ranges.

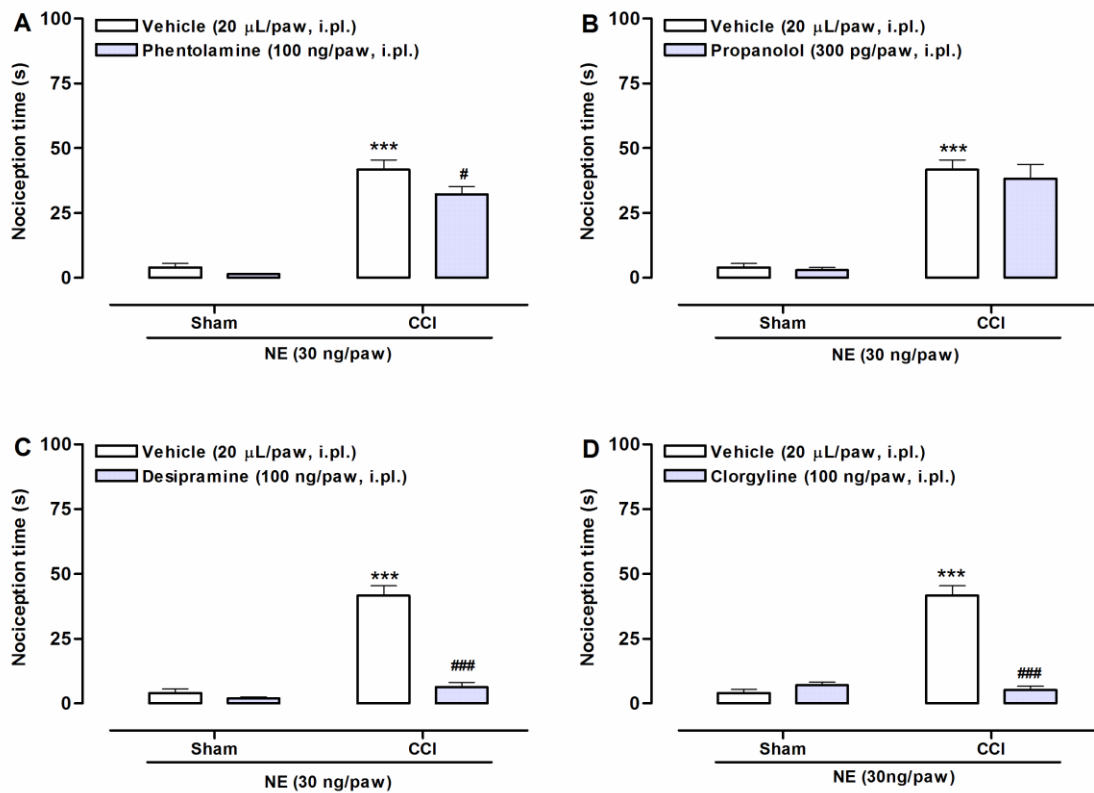




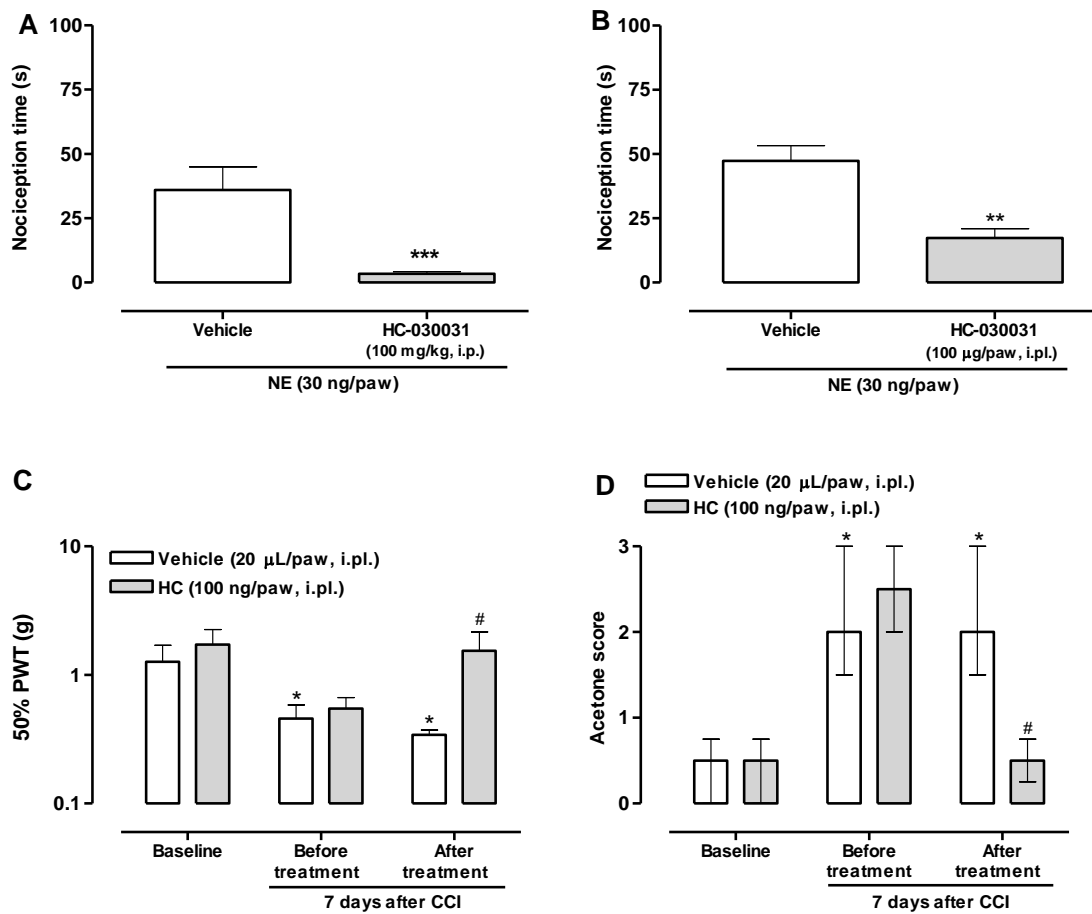
**Figure 3. TRPA1 agonist-induced nociception in neuropathic mice.** A) Effect of intraplantar AITC (100 ng/paw) and vehicle injection on nociception time in chronic constriction-injured (CCI) and sham-operated mice (n=5). \*\*\*P<0.01 compared to respective vehicle-treated group (unpaired t test). B) Antinociceptive effect of HC-030031 (100 mg/kg, i.p.) pretreatment on the nociception caused by i.pl. injection of AITC (100 ng/paw) in neuropathic mice (n=5 per group). \*\*\*P<0.001 compared with vehicle-treated group (unpaired t test). TRPA1 immunoreactivity in the right hind paw (C) and the injured sciatic nerve (D) seven days after surgery (n=4). Western blot results were expressed as % of control. \*\*P<0.01 compared to sham group (unpaired t test). Data are expressed as the means + SEM.



**Figure 4. CCI-induced nociception is sympathetically maintained.** A-B) Effect of the chemical sympathectomy produced by guanethidine (30 mg/kg, i.p.) in mechanical (A) and cold (B) allodynia-induced CCI in mice (n=8 per group). \*\*\*P<0.001 compared with baseline; ###P<0.001 compared with vehicle-treated group (unpaired t test for A and Mann Whitney's test for B). Data are expressed as the means + SEM (A) or median ± interquartile ranges (B). C) Effect of intraplantar noradrenaline (30 ng/paw) and vehicle injection on nociception in chronic constriction-injured (CCI) and sham-operated mice (n=8). \*\*\*P<0.01 compared to the respective sham group (unpaired t test).



**Figure 5. Peripheral mechanisms involved in NE-induced nociception in neuropathic mice.** Effect of intraplantar co-administration of phentolamine (100 ng/paw, A), Propranolol (300 pg/paw, B), desipramine (100 ng/paw, C) and clorgyline (100 ng/paw, D) with NE (30 ng/paw) in sham-operated and chronic constriction-injured (CCI) animals (n=6-8 per group). \*\*\*P<0.001, compared with vehicle-treated sham-operated animals, ##P<0.05, ###P<0.001, compared with vehicle-treated CCI animals (two-way ANOVA). Data are expressed as the means + SEM.



**Figure 6. Peripheral TRPA1 receptor is involved in NE-induced nociception, cold and mechanical allodynia caused by nerve injury.** A-B) Effect of systemic (A, 100 mg/kg, i.p.) and peripheral (B, 100 µg/paw, i.pl.) HC-030031 treatment on the nociception caused by NE (30 ng/paw, i.pl.) in neuropathic mice (n=5 per group). <sup>\*\*\*</sup>P<0.001, <sup>\*\*</sup>P<0.01, compared with vehicle-treated group (unpaired t test). C-D) Mechanical (C) and cold (D) allodynia induced by CCI in mice before and 1 hour after the peripheral treatment with HC-030031 (100 µg/paw, i.pl.) (n=6 per group). <sup>\*</sup>P<0.05, compared with baseline (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for C and Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for D); <sup>##</sup>P<0.05, compared with vehicle-treated animals (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for C and Mann Whitney's test for D). Data are expressed as the means + SEM in A, B and C and as the median ± interquartile ranges in D.

## Carta referente à submissão do artigo

ADONIS mass 0969 - www.adonis.com/mass 0969/chemistry - Quantitative & Qualitative Analysis in One Platform. Learn more from:

Submission Confirmation Entrada x



12:48 (57 minutos atrás) ☆



**The Journal of Pain**

para mim ▾

Dear Professor Juliano Ferreira,

Your submission entitled "The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain" 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/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jpain/automail_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/paincopyright.pdf](http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/paincopyright.pdf) and may fax it to [312-275-7776](tel:312-275-7776).

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System



ees.elsevier.com/jpain/ees/aut.asp Google

**The Journal of Pain**  
OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN PAIN SOCIETY

Contact us Help ? Editors' Update on Open Access: Read [more...](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: ferreira99  
Role: Author ▾

Version: EE

**Submissions Being Processed for Author Juliano Ferreira, Ph.d**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View QC Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>		The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain	24 Apr 2012	24 Apr 2012	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

---

## **5. CONCLUSÕES**

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

- A ativação do receptor TRPA1 é importante para a manutenção da nocicepção no modelo de dor neuropática causada por CCI em camundongos;
- Não houve alteração na imunoreatividade do receptor TRPA1 na pata de animais neuropáticos, enquanto no nervo ciático houve uma redução significativa, indicando uma resposta nociceptiva devido um aumento da função do receptor;
- A constrição crônica do nervo ciático (CCI) pode ser caracterizado como um modelo de dor mantido pelo simpático;
- A ativação do adrenoceptor alfa, a recaptação e o metabolismo da noradrenalina assim como a estimulação do receptor TRPA1 são mecanismos periféricos envolvidos na nocicepção induzida pela norepinefrina em animais neuropáticos.

---

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. **Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat.** *Neuroscience* 111: 389-397, 2002.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review.** *Brain Res* 1000: 40-56, 2004.
- ANDERSSON, D.A.; GENTRY, C.; MOSS, S.; BEVAN, S. **Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress.** *J Neurosci* 28:2485-94, 2008.
- ANDRADE, E.L.; LUIZ, A.P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J.B. **Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice.** *Neuroscience*. 152:511-20, 2008.
- BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; et al. **Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin.** *Neuron* 41: 849-857, 2004.
- BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; et al. **Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin.** *Neuron* 41: 849-857, 2004.
- BARRIÈRE DA, RIEUSSET J, CHANTERANNE D, BUSSEROLLES J, CHAUVIN MA, CHAPUIS L, SALLES J, DUBRAY C, MORIO B. **Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization.** *Pain*. 2011 Dec 14. [Epub ahead of print]
- BARON, R. E BINDER, A. **How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept.** *Orthopade* 33:568-75, 2004.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHRER, G.; JULIUS, D. **Cellular and molecular mechanisms of pain.** *Cell* 139:267-84, 2009.
- BASBAUM, A.I.; GAUTRON, M.; JAZAT, F.; MAYES, M.; GUILBAUD, G. **The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study.** *Pain* 47: 359-367, 1991.
- BAUTISTA, D.M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; et al. **TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents.** *Cell* 124:1269-1282, 2006.
- BEJARANO, P. F. E HERRERO, J. F. **A Critical Appraisal of COX-2 Selective Inhibition and Analgesia: How Good So Far?** *Pain Pract* 3:201-17, 2003.
- BENNET, G. J.; XIE, Y. K. **A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.** *Pain* 33: 87-107, 1988.
- BESSON, J.M. **The neurobiology of pain.** *Lancet* 353:1610-1615, 1999.

- BODKIN, J.V.; BRAIN, S.D. **Transient receptor potential ankyrin 1: emerging pharmacology and indications for cardiovascular biology.** Acta Physiol, 203:87-98, 2011.
- BOUCHER, T. J.; OKUSE, K.; BENNETT, D. L.; MUNSON, J. B.; WOOD, J. N. E MCMAHON, S. B. **Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states.** Science 290:124-7, 2000.
- BOYCE-RUSTAY, J.M.; JARVIS, M.F. **Neuropathic Pain: Models and Mechanisms.** Current Pharmaceutical Design 15:1711-6, 2009.
- CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; 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.
- CAMPBELL, J.N.; MEYER, R.A. **Mechanisms of neuropathic pain.** Neuron 52:77-92, 2006.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. **The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.** Nature 389:816-24, 1997.
- CHENG, J. K.; JI, R. R. **Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain.** Neurochem Res 33:1970-8, 2008.
- CHONG, M.S.; BAJWA, Z.H. **Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain.** Journal of Pain and Symptom Management 25:S4-S11, 2003.
- CHUDLER, E.H.; ANDERSON, L.C. **Behavioral and electrophysiological consequences of deafferentation following chronic constriction of the infraorbital nerve in adult rats.** Arch Oral Biol 47:165-72, 2002.
- CLAPHAM, D.E. **TRP channels as cellular sensors.** Nature 426: 517-24, 2003.
- COREY, D.P.; GARCÍA-AÑOVEROS, J.; HOLT, J.R; et al. **TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells.** Nature 432:723-730, 2004.
- COSENS, D.J.; MANNING, A. **Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant.** Nature 224:285-7, 1969.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. **Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage.** Annu Rev Neurosci 32:1-32, 2009.
- COUTAUX, A. ; ADAM, F. ; WILLER, J.C.; LE BARS, D. **Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms.** Joint Bone Spine. 72: 359-371, 2005.
- CRUCCU, G.; TRUINI, A. **Tools for assessing neuropathic pain.** PLoS Med 6:e1000045, 2009.

- CUELLO, A.C.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; MA, W.; DE KONINCK, Y.; HENRY, J.L. **Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates.** Regul Pept 46:155-164, 1993.
- DECOSTERD, I.; WOOLF, C.J. **Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.** Pain 87:149-58, 2000.
- DEL CAMINO D.; MURPHY, S.; HEIRY, M.; et al. **TRPA1 contributes to cold hypersensitivity.** J Neurosci. 30:15165-74, 2010.
- DEVOR, M. **Strategies for finding new pharmacological targets for neuropathic pain.** Curr Pain Headache Rep. 8:187-91, 2004.
- DEVOR, M.; WANG, A.; RENVALL, M.; FEIGAL, D.; RAMSDELL, J. **Compliance with social and safety recommendations in an outpatient comprehensive geriatric assessment program.** J Gerontol 49:M168-173, 1994.
- DICKENSON, A. H., MATTHEWS, E. A. E SUZUKI, R. **Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants.** Eur J Pain 6:51-60, 2002.
- DINA, O.A.; KHASAR, S.G.; ALESSANDRI-HABER, N.; et al. **Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy.** Eur J Neurosci 28:1180-90, 2008.
- DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. **Nociceptors: the sensors of the pain pathway.** J Clin Invest 120:3760-72, 2010.
- DWORKIN, R.H.; O'CONNOR, A.B.; BACKONJA, M., et al. **Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations.** Pain 132:237-51, 2007.
- EID SR, CROWN ED, MOORE EL, LIANG HA, CHOONG KC, DIMA S, HENZE DA, KANE SA, URBAN MO. **HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory and neuropathy induced mechanical hypersensitivity.** Mol Pain 4:48, 2008.
- FAZEN, L.E.; RINGKAMP, M. **The pathophysiology of neuropathic pain: A review of current research and hypotheses.** Neurosurgery Quarterly 17:245-62, 2007.
- FINNERUP, N. B., OTTO, M., MCQUAY, H. J., JENSEN, T. S. E SINDRUP, S. H. **Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal.** Pain 118:289-305, 2005.
- FINNERUP, N.B.; JENSEN, T. S. **Spinal cord injury: mechanisms and treatment.** European Journal of Neurology, v. 11, p. 73-82, 2004.
- FREYNHAGEN, R.; BENNETT, M.I. **Diagnosis and management of neuropathic pain.** BMJ 339:b3002, 2009.

- GALLUZZI, K.E. **Managing neuropathic pain.** J Am Osteopath Assoc 107: ES39-48, 2007.
- GATCHEL, R.J.; PENG, Y.B.; PETERS, M.L.; FUNCHS, P.N.; TURK, D.C. **The biopsychosocial approach to chronic pain: scientific advances and future directions.** Psychol Bull 133: 581-624, 2007.
- GAUDET, R. **Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments.** J Gen Physiol 133, 231–237, 2009.
- GEPPETTI, P.; PATACCHINI, R.; NASSINI, R.; MATERAZZI, S. **Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel.** Lung Suppl 1:S63-8, 2010.
- GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. **The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules.** Biol Res Nurs. 7:297-312, 2006.
- HAANPAA, M.L.; BACKONJA, M.M.; BENNETT, M.I.; et al. **Assessment of neuropathic pain in primary care.** Am J Med 122:S13-21, 2009.
- HARDEN, N.; COHEN, M. **Unmet needs in the management of neuropathic pain.** J. Pain Symptom Management 25:12-17, 2003.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **Newsletter Issue 18 August, 2011.**
- JANIG, W. E BARON, R. **Complex regional pain syndrome: mystery explained?** Lancet Neurol 2:687-97, 2003.
- JAUQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. **An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts.** J Biol Chem 274: 7325-7333, 1999.
- JENSEN, T. S. **Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence.** Eur J Pain 6:61-8, 2002.
- JENSEN, T.S.; FINNERUP, N.B. **Management of neuropathic pain.** Curr Opin Support Palliat Care 1:126-31, 2007.
- JI, R. R.; STRICHARTZ, G. **Cell signaling and the genesis of neuropathic pain.** Sci STKE (252):reE14, 2004.
- JI, R.R.; WOOLF, C.J. **Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain.** Neurobiol Dis 8:1-10, 2001.
- JI, R.R.; WOOLF, C.J. **Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain.** Neurobiol Dis 8(1):1-10, 2001.

- JORDT, S.E.; BAUTISTA, D.M.; CHUANG, H.H.; et al. **Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1.** Nature 6971: 260-5, 2004.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. **Molecular mechanisms of nociception.** Nature 413:203-210, 2001.
- KAJANDER, K.C.; BENNETT, G.J. **Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in Ab and Ad primary afferent neurons.** J. Neurophysiol 68:734-744, 1992.
- KASHIBA, H.;UEDA Y.; SENBA E. **Coexpression of preprotachykinin-A, alpha calcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons.** Neuroscience 70:179-89, 1996.
- KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. **Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries an anatomical perspective.** Ann Anat 191:248-59, 2009.
- LATORRE, R.; ZAELZER, C.; BRAUCHI, S. **Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels.** Q Rev Biophys 42: 201-46, 2009.
- LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. **TRP channels: targets for the relief of pain.** Biochim Biophys Acta 1772:989-1003, 2007.
- LOESER, J.D. **The future. Will pain be abolished or just pain specialists?** Minn Med 84:20-21, 2001.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** Pain 137: 473-477, 2008.
- MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. **Chronic neuropathic pain and its control by drugs.** Pharmacology & Therapeutics 75: 1-19, 1997.
- MACPHERSON, L.J.; GEIERSTANGER, B.H.; VISWANATH, V.; et al. **The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin.** Curr Biol 10: 929-34, 2005.
- MARTINS, S.; COSTA-ARAÚJO, J.; FADEL, S.P.; et al. **Reversal of neuropathic pain by HSV-1-mediated decrease of noradrenaline in a pain facilitatory area of the brain.** Pain 151:137-145, 2010.
- MCLACHLAN, E.M.; JANIG, W.; DEVOR, M.; MICHAELIS, M. **Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia.** Nature 363:543-546, 1993.
- MCNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM J.; BAUTISTA, D.M.; et al. **TRPA1 mediates formalin-induced pain.** Proc Natl Acad Sci U S A 104:13525-30, 2007.

- MEYER, RA.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception.** In: MCMAHON SB, KOLTZENBURG M. Wall and Melzack's Textbook of Pain. Philadelphia: Elsevier, p. 3–34, 2008.
- MINKE, B. **Drosophila mutant with a transducer defect.** Biophys. Struct. Mech 3:59-64, 1977.
- MINKE, B. **The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily.** J Neurogenet 24:216-33, 2010.
- MONTELL, C. **Mg<sup>2+</sup> homeostasis: the Mg<sup>2+</sup>nificant TRPM chanzymes.** Curr Biol 13:R799-801, 2003.
- MONTELL, C. **The TRP superfamily of cation channels.** Sci STKE 22, 2005.
- MOORE, K.A.; BABA, H.; WOOLF, C.J. **Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn.** Prog Brain Res 129:63-80, 2000.
- MOORE, K.A.; KOHNO, T.; KARCHEWSKI, L.A.; SCHOLZ, J.; BABA, H.;WOOLF, C.J. **Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord.** J Neurosci 22:6724-6731, 2002.
- NAGATA, K.; DUGGAN, A.; KUMAR, G.; GARCÍA-ANÓVEROS, J. **Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing.** J. Neurosci 25:4052- 4061, 2005.
- NICHOLSON, B. **Gabapentin use in neuropathic pain syndromes.** Acta Neurol Scand. 101:359-371, 2000.
- NIEDERBERGER, E.; KUHLEIN, H.; GEISSLINGER, G. **Update on the pathobiology of neuropathic pain.** Expert Rev Proteomics 5:799-818, 2008.
- OBATA, K.; KATSURA, H.; MIZUSHIMA, T.; et al. **TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury.** J Clin Invest 115:2393-401, 2005.
- O'CONNOR, A.B.; DWORKIN, R.H. **Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines.** Am J Med 122:S22-32, 2009.
- PAIN. **Classification of chronic pain syndromes and definitions of pain terms.** Pain 1986 Supplement 3.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. **Transient receptor potential channels: targeting pain at the source.** Nat Rev Drug Discov 8:55-68, 2009.
- PEDERSEN, S.F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. **TRP channels: an overview.** Cell Calcium 38:233-52, 2005.

- PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. **Opioids in chronic pain.** Eur J Pharmacol 429:79-91, 2001.
- SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. **Pathophysiology of pain.** Langenbecks Arch Surg 389:237-43, 2004.
- SCHWARTZMAN, R.J.; GROTHUSEN, J.; KIEFER, T.R.; ROHR, P. **Neuropathic central pain: epidemiology, etiology, and treatment options.** Arch Neurol 58:1547-50, 2001.
- SELTZER, S. **Long-term radiographic and histological observations of endodontically treated teeth.** J Endod 25:818-22, 1999.
- SHIH, J.C.; CHEN, K.; RIDD, M.J. **Monoamine oxidase: from genes to behavior.** Annu Rev Neurosci 22:197-217, 1999.
- SMITH, M.P.; BEACHAM, D.; ENSOR, E.; KOLTZENBURG, M. **Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system.** Neuroreport 15:1399-1403, 2004.
- STAAF S, OERTHER S, LUCAS G, MATTSSON JP, ERNFORS P. **Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain.** Pain 144(1-2):187-99, 2009.
- STANTON-HICKS, M.; JÄNIG, W.; HASSENBUSCH, S.; HADDOX, J.D.; BOAS, R.; WILSON, P. **Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy.** Pain 63:127-33, 1995.
- STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; et al. **ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures.** Cell 112: 819-829, 2003.
- TAKAHASHI, M., KAWAGUCHI, M., SHIMADA, K., KONISHI, N., FURUYA, H. E NAKASHIMA, T. **Peri-sciatic administration of indomethacin early after nerve injury can attenuate the development of tactile allodynia in a rat model of L5 single spinal nerve injury.** Neurosci Lett 356:37-40, 2004.
- THOMAS CHENG H. **Spinal cord mechanisms of chronic pain and clinical implications.** Curr Pain Headache 14:213-20, 2010.
- TOMINAGA, M. **Nociception and TRP channels.** Handb. Exp. Pharmacol. 179: 489-505, 2007.
- TORRANCE, N.; SMITH, B.H.; BENNETT, M.I.; LEE, A.J. **The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey.** J Pain 7:281-9, 2006.
- TREVISANI, M.; SIEMENS, J.; MATERAZZI, S.; et al. **4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through**

- activation of the irritant receptor TRPA1.** Proc Natl Acad Sci U S A 104:13519-24, 2007.
- TURK, D.C.; WILSON, H.D.; CAHANA, A. **Treatment of chronic non-cancer pain.** Lancet 377:2226-35, 2011.
- WERMELING, D. P. E BERGER, J. R. **Ziconotide infusion for severe chronic pain: case series of patients with neuropathic pain.** Pharmacotherapy 26:395-402, 2006.
- WHITE, F.A.; JUNG, H.; MILLER, R.J. **Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain.** PNAS 104:20151-20158, 2007.
- WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. **Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.** Science 288:1765-9, 2000.
- WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** Lancet 353:1959-64, 1999.
- XIE, J.; HO LEE, Y.; WANG, C.; MO CHUNG, J. E CHUNG, K. **Differentia expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNAs in the dorsal roo ganglion after spinal nerve ligation.** Brain Res Mol Brain Res 93:164-72, 2001.
- YODIM, M.B.H.; EDMONDSON, D., TRIPTON, K.F. **The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors.** Nat Rev Neurosci 7:295-309, 2006.
- ZIMMERMANN, M. **Pathobiology of neuropathic pain.** Eur J Pharmacol 429:23-37, 2001.