

Catarine Massucato Nishijima

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CITRAL NA DOR
NEUROPÁTICA E NA INFLAMAÇÃO**



ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
(UNESP-Botucatu) para obtenção para o título de Doutor em
Ciências Biológicas (área de concentração: Farmacologia)

Botucatu
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Nishijima, Catarine Massucato.

Avaliação do efeito do citral na dor neuropática e na inflamação / Catarine Massucato Nishijima. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-lima

Capes: 21000000

1. Sistema nervoso – Ferimentos e lesões. 2. Dor pós-operatória. 3. Neuropatia. 4. Terpenos.

Palavras-chave: Citral; Dor neuropática; Dor pós-operatória; Monoterpeno; Síndrome da dor complexa regional.

Dedicatória:

Em primeiro lugar a Deus, que tem me abençoado e me sustentado durante a caminhada.

Aos meus pais Mario e Efigenia e minha irmã Cassia que sempre me apoiaram e me incentivaram nos estudos e na vida.

Aos meus amigos, não vou citar todos os nomes, mas são aqueles que sempre se alegraram com as minhas alegrias.

Agradecimentos à equipe e colaboradores:

À profa Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, minha orientadora. Obrigada por acreditar em mim, agradeço pela confiança, apoio profissional e preocupação "materna". Além de excelente profissional, meu exemplo de simplicidade, honestidade e caráter.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos. Sua colaboração e seu laboratório foram imprescindíveis para a execução desse trabalho. Obrigada pelas sugestões pertinentes na área de dor, bem como aos seus alunos Daniel, Leidiane, Catharina e Juliana pela agradável companhia, ajuda e extrema dedicação na execução desses experimentos. Foi realmente muito enriquecedor.

À professora profa. Dra. Lucia Regina Machado da Rocha, sempre presente com suas sugestões didáticas nas apresentações. Obrigada pelo apoio pessoal e profissional. E é claro, pelo espaço físico do "laboratório verde".

Aos colegas de laboratório que conviveram comigo durante todos esses anos. Muito obrigada pela ajuda nos experimentos, companheirismo, amizade, obrigada pelas lições de vida e todo aprendizado interpessoal e acadêmico.

Aos animais e vegetais, sem eles esse estudo não seria realizado.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Fisiologia pelo suporte para realização de nossos trabalhos.

À seção de pós-graduação pelos serviços prestados.

À FAPESP e ao BIOTA-FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto e ao laboratório.

PRÓLOGO

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos a dor aguda inflamatória, dor neuropática e estudos em paralelo com o trato gastrointestinal (linha de pesquisa tradicional de nosso laboratório). Durante a execução deste projeto, várias outras atividades foram realizadas no intuito de enriquecer a formação acadêmica.

As atividades realizadas durante o doutorado envolveram:

Disciplinas Coursadas:

1º semestre 2010:

1) *Tópicos de Atualização em Ciências* (disciplina obrigatória) – 2 créditos: conceito A (excelente).

2) *Farmacologia de Plantas Medicinais com atividade anti-nociceptiva (analgésica) e anti-inflamatória* (Prof. Dr. Adair Roberto S. dos Santos- Universidade Federal de Santa Catarina) – 2 créditos: conceito A (excelente).

2º semestre 2010:

3) *Aluna especial na disciplina " Farmacodinâmica"* ministrada pela Prof. Dra. Cleópatra da Silva Planeta no período de 01 de outubro a 19 de novembro na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP campus Araraquara (4 créditos): conceito A (excelente).

4) *Aluna especial na disciplina de "Identificação de espécies vegetais com potencial farmacológico"* ministrada pelo Prof. Dr. Luis Vitor Sacramento no período de 04 de

agosto a 29 de setembro na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP campus Araraquara (4 créditos): conceito A (excelente).

5) *Tópicos de Atualização em Ciências (disciplina obrigatória) – 2 créditos: conceito A (excelente).*

1º semestre 2011:

6) *Aluna especial na disciplina Divulgando e Popularizando a Ciência. Interação entre Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia* organizada pela Prof. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima - 6 créditos: conceito A (excelente).

7) *Farmacologia Avançada* (disciplina obrigatória) – 4 créditos: conceito B (bom).

2º semestre 2011:

8) *Receptores Farmacológicos* (disciplina optativa) – 3 créditos: conceito A.

1º semestre 2012:

9) *Farmacocinética* (disciplina optativa) – 4 créditos: conceito A (excelente).

Participação em Cursos como ouvinte:

1) *Curso Teórico-Prático de Biologia Molecular: Marcadores Moleculares*. No período de 31 de janeiro a 5 de fevereiro fornecido pela Genotyping Biotecnologia. Carga horária de 44 horas

2) *Biology of kinase proteins: exemplification with the immune system* (duração de 3 horas). 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto, 18 a 21 de outubro de 2010.

3) *Strategies for the Discovery and Development of New Drugs from Natural Products*, no 7th Biota Symposium, em USP, São Carlos, julho de 2011.

4) *Curso sobre "Animales de Laboratorio"*, na Universidade de Buenos Aires (UBA), Argentina, de 11 a 12 de julho de 2011.

Participação de cursos como palestrante:

1) *Palestrante do Curso de Atualização em Plantas Medicinais*. Com duração de 7 horas e meia , no 14º Encontro Nacional de Biomedicina, realizado na cidade de Botucatu-SP.

2) *Palestrante no Curso de Inverno de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu sobre o tema Plantas medicinais e modelos de nocicepção*.

3) *Palestrante no X Workshop de Plantas Medicinais Da Tradição ao Fitoterápico no curso: "Atividade analgésica de plantas medicinais"*, realizado no Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu.

Co-orientação de alunos de Iniciação científica e mestrado:

1) *Rosanna Tarkany Basting (bolsista IC FAPESP)*

Projeto: Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* Kunth DC.

2) *Vania Vasti Nunes Alfieri (bolsista Mestrado CAPES)*

Projeto: Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* CAMBESS na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais com roedores.

Apresentação de Trabalho em Congressos:

1) *Effect of methanolic extract and fractions from Davilla elliptica leaves (Dilleniaceae) on MMPs in Bothrops jaracaca envenomation and inflammation*.

- Nishijima, C.M., Delella, F.K., Bruni, F.M., Rodrigues, C.M., Vilegas, W., Lopes-Ferreira, F.K., Felisbino, S., Hiruma-Lima, C.A. SBFTE 2010
- 2) *Hydroalcoholic extract of Eugenia punicifolia (KUNTH), DC and Myrcia bella CAMBESS leaves: Analgesic effect of antidiarrheal in mice.* Nunes, V.V.A., Nishijima, C.A., Santos, R.C., Rocha, L.R.M., Santos, C., Hiruma-Lima, C.A. – apresentado na seção de pôster do 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, CIFARP 2011, em Ribeirão Preto.
 - 3) *Evaluation of gastroprotective and antinociceptive effect of citral-* apresentado no 3rd PharmSciFair 2011, em Praga.
 - 4) *Evaluation of citral in chronic nociception models: partial ligation of the sciatic nerve (PLSN) and chronic post-ischemia reperfusion pain (CPIP) in mice.* Nishijima, C.M., Stramosk, J., Mazzardo-Martins, L., Martins, D., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. Congresso Europeu de Farmacologia 2012 (Granada, Espanha).
 - 5) *Anti-nociceptive effect of citral in acute nociception models: induced by formalina and plantar incision in mice.* Nishijima, C.M., Stramosk, J., Mazzardo-Martins, L., Martins, D., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. SBFTE 2012.
 - 6) *Anti-nociceptive and antidiarrheal effect of hidroalcoholic extract from Machaerium hirtum (inner barks) and the involvement of opioid system.* Lopes, J.A., Nishijima, C.M., Hiruma-Lima, C.A., Rocha, L.R.M., Sannomiya, M., Souza-Maria, N.C.V., Tangerina, M.M., Vilegas, W. SBFTE 2012.
 - 7) *Anti-nociceptive and anti-edematogenic effects of Machaerium Hirtum (Vell) Stell (inner barks) and the involvement of glutamate and l-arginina-NO pathways.* Lopes, J.A., Nishijima, C.M., Maria, N.C.V.S., Sannomyia, M.,

Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. V Simpósio Internacional de Pós-graduação e Pesquisa 2012 (USP-Ribeirão Preto).

8) *Anti-nociceptive and anti-edematogenic effects of Eugenia punicifolia Kunth DC and the involvement of glutamate and l-arginina-NO pathways.* Lopes, J.A., Nishijima, C.M., dos Santos, R. C., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. V Simpósio Internacional de Pós-graduação e Pesquisa 2012 (USP-Ribeirão Preto).

9) *Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de Eugenia punicifolia Kunth DC.* Basting, R.T., Nishijima, C.M., Lopes, J.A., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. Congresso de Iniciação Científica da UNESP 2012.

10) *A study of antiinflammatory effect of hidroalcoholic extract from the leaves of Cissus sycioides Linn (Vitaceae) in rodents.* Beserra, F. P., Périco, L.L., Lopes, J.A., Nishijima, C.M., dos Santos, R.C., Saldanha, L.L., da Rocha, L.R.M., Dokkedal, A.L., Hiruma-Lima, C.A. Congresso Internacional de Produtos Fitofarmacêuticos 2013, Bogotá-Colômbia.

Exame de Qualificação:

Exame de qualificação do doutorado em farmacologia consistiu na elaboração de um projeto de pós-doutorado original (e orçamento detalhado de materiais de consumo) intitulado: *Efeito de (-)-linalool na dor neuropática induzida pelo quimioterápico oxaliplatina.*

Artigo publicado (co-autoria):

- 1) *Qualea parviflora* Mart: *Na integrative study to valdate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action.* Journal of Ethnopharmacology 127 (2)3, 2010, 508-514. Mazzolin, L.P., Nasser, A.L.M., Moraes, T.M., Santos, R.C., Nishijima, C.M., Santos, F.V., Varanda, E.A., Bauab, T.M., Rocha, L.R.M., Di Stasi, L.C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A.

Artigo submetido:

- 1) Artigo submetido ao European Journal of Pharmacology (na categoria neurofarmacologia e analgesia): *Prophylactic and therapeutic antinociceptive effect of terpenoid citral in mouse models of acute and chronic pain.* Autores: Catarine M Nishijima; Ellen G Ganev; Leidiane Mazzardo-Martins; Adair Soares; Daniel Martins; Clelia Akiko Hiruma-Lima

Plano de execução do projeto:

Experimentos inicialmente propostos à FAPESP	Experimentos realizados
Modelos agudos	Modelos agudos
Formalina (curva) Formalina (envolvimento NO) Formalina (envolvimento 5HT) Formalina (envolvimento opióide) Placa quente Nocicepção induzida por glutamato (ipl.) Edema de pata induzido por carragenina Edema de pata induzido por substância P Edema de pata induzido por histamina Quantificação de citocina IL-1 β na pata	Formalina (curva) Formalina (envolvimento NO) Formalina (envolvimento 5HT) Formalina (envolvimento opióide) Placa quente Nocicepção induzida por glutamato (ipl.) Nocicepção induzida por PMA (ipl.) Nocicepção induzida por cinamaldeído (ipl.) Nocicepção induzida por mentol (ipl.) Nocicepção induzida por capsaicina (ipl. e i.t.) Nocicepção induzida por agonistas NMDA e trans-ACPD (i.t.) Nocicepção induzida por TNF- α (i.t.) Nocicepção induzida por substância P (i.t.) Edema de orelha induzido por xilol Edema de orelha induzido por ácido araquidônico Incisão intraplantar (modelo de dor aguda pós-operatória)
Modelos de atividade locomotora	Modelos de atividade locomotora
Barra giratória	Barra giratória Campo aberto
Modelos crônicos	Modelos crônicos
Esmagamento do nervo ciático e avaliação funcional	Neuropatia pós Isquemia e reperfusão (inicial e tardio) Constricção do nervo ciático (hipernocicepção mecânica)

Lista de abreviaturas:

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

AMPA: ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il)propanóico

ANOVA: análise de variância

BK: bradicinina

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CPNC: constrição parcial do nervo ciático

DCIR: dor crônica pós- isquemia e reperfusão

DPO: dor pós-operatória

GABA: ácido gama-aminobutírico

IL: interleucina

ipl.: injeção intraplantar

i.t.: injeção intratecal

L-NAME: N ω - nitro- l-arginina

NGF: fator de crescimento neural

NMDA: N-metil-d-aspartato

NO: óxido nítrico

NK1: receptor de neurocininas

PAG: substância cinzenta periarquedutal

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PMA: forbol miristato acetato (ativador de PKC)

p.o: administração por via oral

RVM: medula rostral ventromedial

SDCR-I: síndrome da dor complexa regional tipo I

SP: substância P

TNF- α : fator de necrose tumoral

Trans-ACPD: ($\pm$) ácido 1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico

TRP: receptor de potencial transitório

TRPV: receptor vanilóide

TRPA: "TRPAnkyrin"

TRPM: "TRPMelastatin"

1. RESUMO:

Lesões do sistema nervoso periférico que resultam em dor neuropática podem evoluir em substancial perda funcional e diminuição da qualidade de vida do paciente pelo permanente prejuízo das funções sensório-motoras. Cirurgias comuns tais como cirurgia da mama, cirurgias cardíacas, torácicas, abdominais, cesarianas e amputações culminam com o quadro de dor aguda pós-operatória (DPO) seguida de dor persistente. Aproximadamente 10 % dos pacientes evoluem para dor crônica com duração entre 3 a 6 meses após a cirurgia. A sensação dolorosa é exacerbada por atividades cotidianas como caminhar, tossir e por estímulos inócuos como toque e temperatura. Outra condição clínica investigada no presente trabalho é a dor crônica na Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I (SDCR-I). SDCR-I é uma neuropatia crônica de origem multifatorial, decorrente de injúria tecidual profunda tais como torções, fraturas, utilização de torniquete, infarto, acidente vascular encefálico e alterações vasculares como no fenômeno de Raynaud. A condução clínica da dor neuropática é complexa, uma vez que ela se mostra refratária a maioria dos medicamentos analgésicos disponíveis no mercado, razão pela qual existe um grande interesse na avaliação de novos agentes com potencial anti-nociceptivo. Citral, um terpeno amplamente encontrado em óleos essenciais de capim-cidreira, melissa, citronela, entre outras espécies vegetais, tem se destacado pelas suas propriedades farmacológicas, dentre elas seu efeito agonista em canais TRPs (receptor de potencial transitório). Neste trabalho constatamos que citral nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg (p.o) apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos agudos de nocicepção e inflamação (teste da formalina, placa quente, dor aguda pós-operatória e edema de orelha induzido por xilol) sem alterar a coordenação e a performance locomotora dos animais. Animais

tratados com citral apresentaram redução do limiar nociceptivo nos modelos de dor crônica pós-isquemia e reperfusão (DCIR) e constrição parcial do nervo ciático (CPNC), com efeito máximo obtido na dose de 100 mg/kg (p.o) entre 1 a 2 horas após a administração. Citral (100 mg/kg, p.o) foi capaz de inibir o comportamento de *licking* induzido pela injeção intraplantar de glutamato, forbol miristato (ativador de PKC), cinamaldeído (agonista TRPA1), mentol (agonista TRPM8) e o comportamento de *bitting* induzido pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos do tipo NMDA e trans-ACPD, substância P e TNF- α , indicando portanto que esses mediadores/receptores estão envolvidos no mecanismo de ação anti-nociceptivo do citral. Por sua vez, sistema opióide e óxido nítrico não demonstraram envolvimento no mecanismo de ação do citral. Já o pré-tratamento dos animais com ketanserina foi capaz de reverter o efeito anti-nociceptivo do citral no modelo da formalina, evidenciando o papel dos receptores 5HT- 2_A na modulação da transmissão nociceptiva pelo citral. Com esses dados, podemos concluir que citral, administrado via oral, apresenta potencial para tratamento da dor neuropática, tais como a dor na Síndrome da Dor Complexa Regional e na dor aguda pós-operatória, condições que tem representando um desafio na terapêutica clínica. Verificamos que seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da transmissão nociceptiva via PKC, TNF- α , substância P, receptores glutamatérgicos (NMDA e metabotrópicos), 5HT- 2_A , TRPA1 e TRPM8.

1. ABSTRACT:

Injuries to the system peripheral nervous that result in neuropathic pain may evolve substantial functional loss and decreased quality of life of patients by permanent loss of sensory-motor functions. Surgeries such as breast, cardiac, thoracic, abdominal surgeries, caesarean and amputations culminate with the acute postoperative pain (APP) followed by persistent pain. Approximately 10% of patients develop chronic pain lasting between 3-6 months after surgery. The sensation of pain is exacerbated by simple activities such as walking, coughing and innocuous stimuli as touch and temperature. Another clinical condition investigated in this work is the chronic pain in Complex Regional Pain Syndrome type I (CRPS- I). CRPS- I is a multifactorial chronic neuropathy, resulting from deep tissue injury such as sprains, fractures, tourniquet, heart attack, stroke and vascular changes as Raynaud's phenomenon. The clinical management of neuropathic pain is complex, since it shows refractory to medications available, so this is the reason to evaluation of new agents with potential antinociceptive. Citral, a terpene widely found in essential oils of lemongrass, melissa, among other species, have been studied for its pharmacological properties, such as its agonist effect on channels TRP (transient receptor potential). In this work, we found that citral, at the doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg (p.o), has antinociceptive and antiinflammatory in models of acute nociception and inflammation (formalin test, hot plate, acute postoperative pain and edema xylene -induced ear) without modifying the coordination and locomotor performance of the animals. Mice have exhibited a reduction of nociceptive threshold in chronic pain models after ischemia and reperfusion and partial sciatic nerve constriction with a maximal effect obtained at the

dose of 100 mg/kg (p.o.) between 1 and 2 hours after administration. Citral (100 mg/kg, p.o.) was able to inhibit the licking behavior induced by intraplantar injection of glutamate, phorbol myristate acetate (PKC activator), cinnamaldehyde (TRPA1 agonist), menthol (TRPM8 agonist) and biting behavior induced by injection intrathecal glutamate agonists like NMDA and trans - ACPD, substance P and TNF - α , thus indicating that these mediators/receptors are involved in the mechanism of action. However, the opioid system and nitric oxide showed no involvement in the mechanism of action of citral, whereas, pretreatment of the animals with ketanserin was able to reverse the antinociceptive effect of citral in the formalin model, demonstrating the role of 5HT -2A receptors in the modulation of nociceptive transmission by citral. So we conclude that citral, administered orally, has potential for treatment of neuropathic pain, such as pain in complex regional pain syndrome and acute postoperative pain models, two conditions that have represented a challenge in clinical therapy. We found that its mechanism of action is related to inhibition of nociceptive transmission via PKC , TNF- α , substance P, glutamate receptors (NMDA and metabotropic), 5HT- $2A$, TRPA1 and TRPM8.

2. INTRODUÇÃO:

2.1. Dor neuropática e lesão nervosa

A dor é uma qualidade sensorial subjetiva, difícil de ser descrita ou interpretada, pois é uma experiência multidimensional e não inclui apenas a nocicepção, ou seja, a transdução da lesão em impulso elétrico, mas também implica em componentes cognitivos, afetivos e emocionais (Neugebauer e cols., 2009). Pode ser modulada pelo medo, ansiedade, atenção, expectativa e memória. De fato, indivíduos que sofrem de depressão e ansiedade são mais propensos ao desenvolvimento da dor crônica (deCharms e cols., 2005; Rhudy e cols., 2008). Regiões como amígdala e as áreas corticais pré-frontais são conhecidas pelo seu papel importante na emoção e nas distúrbios afetivos. Estudos sustentam fortemente a relação desse papel como um importante regulador da dor (Price, 2000).

A dor neuropática foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da dor como “uma dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso”. Pode ser iniciada por múltiplos fatores tais como: dieta inadequada (excesso ou falta de vitamina B12), diabetes mellitus (tipo I ou tipo II), inflamações crônicas, quadros infecciosos (como a neuralgia pós-herpética), câncer, amputações, compressões nervosas (hérnia de disco), entre outros. Lesões do sistema nervoso periférico podem resultar em substancial perda funcional e diminuição da qualidade de vida pelo prejuízo permanente das funções sensório-motoras, tendo como consequências sociais longos períodos de afastamento do trabalho (Rosberg e cols., 2005).

As lesões no sistema nervoso podem ser classificadas anatomicamente em: neuropraxia, axoniotmese e neurotmese (Sunderland, 1951). Na neuropraxia, a bainha

do axônio se encontra lesada, porém a fibra nervosa está intacta (sem degeneração). Já na axoniotmese e na neurotmese tem-se a interrupção do axônio e do tronco nervoso, respectivamente, seguido de degeneração Walleriana.

Degeneração Walleriana é uma reação ordenada do sistema nervoso que compreende em interações entre estruturas do axônio com elementos celulares tais como células de Schwann, macrófagos (no sistema nervoso periferia), astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (no sistema nervoso central), liberação de mediadores inflamatórios e quimiotáticos, tais como a calpaína, uma protease cálcio-ativada na célula de Schwann, associada à mielina (Tanaka e cols., 1992; Üçeyler e Sommer, 2006, Saxena e Caroni, 2007).

Calpaína, simultaneamente com a destruição da mielina, causa um rápido “burst” de citocinas pró-inflamatórias e liberação de quimiocinas, conduzindo ao recrutamento de macrófagos circulantes (Üçeyler e Sommer., 2006). No processo da degeneração, ocorre retração do citoplasma da célula de Schwann à medida que macrófagos da circulação sanguínea adentram no nervo através da barreira hemato-encefálica desestruturada e fagocitam os restos de mielina. Após a “limpeza” pelos macrófagos, as células de Schwann se proliferam e o nervo é regenerado (Castaño e cols., 1996; Verdú e Navarro, 1997).

A figura a seguir mostra o processo de regeneração do axônio.

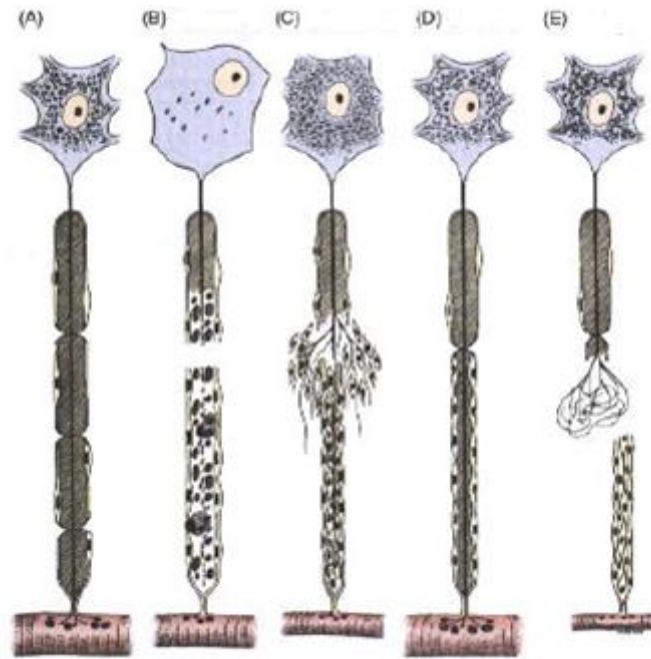


Figura 1: A)Fibra nervosa normal. B) Lesão da fibra seguida de degeneração na parte distal com fragmentos de mielina sendo fagocitados por macrófagos. C) Proliferação das células de Schwann forma um trilho ou cilindro que é penetrado pelo axônio em crescimento (velocidade de crescimento é de 0,5 a 3 mm por dia). D) regeneração bem-sucedida. E) quando o axônio não encontra o cilindro formado pelas células de Schwann, seu crescimento é desordenado, formando assim o "neuroma de amputação". FONTE: Histologia. Junqueira e Carneiro, 2004.

O axônio proximal brota e as faixas distais de células de Schwann mantêm-se em sua orientação original, logo as fibras nervosas são arranjadas como estavam antes da lesão (figura 1 C). Desta forma, quando os axônios se regeneram, eles encontram as suas posições originais dentro do nervo e têm maior probabilidade de se reconectarem de forma precisa com os seus alvos (figura 1D). Assim, a chance de regeneração é maior quando um nervo periférico é comprimido ou esmagado, mas não quando é rompido (figura 1 E).

Queimação, sensibilidade ao frio (alodínia térmica) e ao toque (alodínia mecânica), ataque de dor sem nenhum estímulo aparente, déficit sensorial, dor generalizada e perda de sensibilidade são os sinais clínicos típicos do indivíduo acometido pela dor neuropática. A intensidade da dor varia de acordo com o indivíduo, tipo de nervo, idade e sexo (Treede e cols., 1992; Campbell e Meyer, 2006).

Tic douloureux é um exemplo clássico de dor neuropática conhecida como “dor do trigêmeo”. É uma desordem sem tratamento que envolve severo ataque de dor facial provocada pela compressão mecânica, frequentemente de origem vascular, e que pode ser desencadeada pela luminosidade (Elias e Burchiel, 2002). Outra manifestação recorrente na clínica é a forte sensação de queimação nos dedos dos pés em pacientes diabéticos, uma característica da neuropatia diabética. Trata-se de uma desordem comprimento-dependente, ou seja, a parte mais distal do axônio é a mais vulnerável. Já na neuralgia pós-herpética, a alodínia mecânica é o sintoma mais relatado, em que um suave toque da roupa na pele se torna insuportável, até mesmo quando há perda de inervação pelas fibras C na epiderme (Dyck e cols., 2000).

A dor imediata é um mecanismo protetor de alerta ao organismo, que tem como finalidade a redução do dano tecidual. É produzida por estimulação direta de receptores térmicos e mecânicos e sua transmissão é feita por fibras mielinizadas de condução rápida do tipo A σ (Julius e Basbaum, 2011). Se não ocorre dano tecidual, esse tipo de dor desaparece logo que o estímulo cessa.

Já a dor secundária, também chamada de dor “lenta” ou tardia, é caracterizada pela estimulação de nociceptores polimodais em decorrência de processo inflamatório, cirúrgico ou traumático (Serpell e cols., 1998). Os nociceptores respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos e a condução do estímulo é feita pelas fibras C (não-mielinizadas). Essas fibras, quando estimuladas periféricamente, geram potenciais de ação que ativam canal de sódio voltagem dependente, liberam neuropeptídeos que promovem vasodilatação e acúmulo de mediadores pró-inflamatórios no tecido lesado. Os mediadores pró-inflamatórios, por sua vez, sensibilizam nociceptores que assim poderão ser ativados por estímulos de baixa intensidade (Dray, 1995).

Mediadores inflamatórios agem diretamente em canais iônicos, ou indiretamente, através de sua ligação com receptores de membrana acoplados a proteína G, que modulam vias citosólicas através de segundos mensageiros e por consequência, promovem a ativação de proteínas quinases que atuam na abertura ou fechamento de canais iônicos (Serpell e cols., 1998; Ferreira e cols., 2005).

O corno dorsal espinal é a localização da primeira sinapse na via da dor, sendo assim, a chave da regulação da transmissão da nocicepção (Heinricher e cols., 2009). As células da glia, particularmente a astróglia, estão diretamente envolvidas no controle da atividade neuronal no corno espinal. Citocinas inflamatórias agem como mediadores entre a glia e os neurônios e assumem o papel de neuromoduladoras (Parri e Crunelli, 2007; Watkins e Maier, 2003). As células da glia podem liberar agonistas NMDA, ácido aracdônico, óxido nítrico, componentes que estão intimamente relacionados a hiperalgesia. Essas células possuem receptores purinérgicos que por sua vez promovem a liberação de IL-1 β e TNF- α (Meller e cols., 1994).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a lesão tecidual. Se essa resposta persistir por muitas semanas, então passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, entretanto pode permanecer após a regeneração do tecido lesado (Loeser e Melzack, 1999).

Existe um grande interesse clínico na avaliação de novos agentes analgésicos devido à dificuldade na melhoria do tratamento para grande número de pacientes. Já se sabe que a etiologia e o tratamento da dor produzida pela cirurgia são diferentes de outras condições dolorosas como a artrite reumatóide, fibromialgia ou herpes zoster, por exemplo (Brennan, 2011).

Sendo assim, muitos modelos de dor podem ser úteis para estudos mecanísticos, porém não aplicáveis para a avaliação de novos alvos para a terapêutica (Brennan, 2011). Nesse contexto, o presente trabalho foi estruturado com o intuito de avançar no âmbito da investigação de substâncias com potencial anti-nociceptivo para uso clínico.

2.1.1. Dor aguda pós-operatória (DPO)

Mais de 73 milhões de cirurgias são realizadas anualmente nos Estados Unidos de acordo com pesquisas demonstradas pelo National Center for Health Statistics (2003), e até 75% dos pacientes sentem dor após o procedimento cirúrgico (Schug e Large, 1993; Warrfield e Kahn, 1995, Cousins e cols., 2000).

A dor aguda pós-operatória (DPO) é seguida de dor persistente em decorrência de cirurgias comuns tais como cirurgia da mama, cesarianas, cirurgias torácicas, amputações, cirurgias cardíacas. A sensação dolorosa é exacerbada por atividades cotidianas como caminhar, tossir e estímulos inócuos como toque e variação de temperatura. Aproximadamente 10 % dos pacientes apresentam dor crônica com duração entre 3 a 6 meses após a cirurgia. A dor persistente é consequência de processo inflamatório ou mais comumente, uma manifestação de dor neuropática, resultante da lesão dos nervos periféricos (Pogatzi e cols., 2002; Kehlet e cols., 2006). A intensidade da dor aguda pós-operatória em humanos é proporcional à profundidade da incisão cirúrgica que acomete músculos e fáscia, no entanto, a intensidade da dor não difere em uma incisão de 10 cm e uma incisão de 20 cm de comprimento, ambas realizadas na mesma profundidade (Brennan, 2011).

Embora a intensidade e a duração da DPO aguda sejam variáveis entre os pacientes, todos os quadros apresentam o mesmo mecanismo: lesão direta, inflamação,

liberação de mediadores químicos que sensibilizam os nociceptores periféricos à estímulos térmicos e ao mecânicos (Brennan, 2011).

2.1.2. Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I (SDCR-I)

A Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) possui origem multifatorial e é decorrente de injúria tecidual profunda tais como torções, fraturas, utilização de torniquete, infarto, acidente vascular encefálico e alterações vasculares tais como na doença de Raynaud (Feliu e Edwards, 2010; Coderre e Bennett, 2010). De acordo com Bruehl e Chung, (2006), SDCR é uma manifestação biopsicossocial que integra componentes psicológicos, comportamentais e patofisiológicos.

A síndrome apresenta um grande impacto na qualidade de vida, interferindo no trabalho (incapacitando 62% dos indivíduos), na qualidade do sono (aproximadamente 96 %), na mobilidade (86 %). Duman e cols. 2007 constataram que 1/3 dos pacientes que se enquadram no diagnóstico da SDCR não retornam ao trabalho.

O tratamento para a SDCR representa um desafio importante na clínica médica. A incidência é maior na população de origem caucasiana e oriental, acomete 26,2 a cada 100.000 indivíduos, é 5 vezes mais frequente em mulheres do que em homens, provavelmente devido a maior prevalência de desordens vasculares em mulheres (por exemplo varicoses e doença de Raynaud). Há evidências que o consumo de cigarro aumente significativamente o risco da SDCR devido aos danos que a nicotina provoca nos microvasos (Allen e cols., 1999; de De Mos e cols., 2006).



Figura 2: Paciente acometido pela doença de Raynaud. As extremidades dos dedos apresentam contrastantes mudanças de coloração nos membros e dor após período de isquemia e anormal atividade vasomotora (Gayraud, 2007).

O termo “síndrome da dor complexa regional” se deve pelas seguintes razões: 1- síndrome: conjunto determinado de sintomas ou sinais, 2- complexa: expressa as características clínicas variadas encontradas nessas condições tais como dor (alodínia mecânica, alodínia ao frio e ao calor), edema, atividade vasomotora com mudança de coloração do membro, hiperidrose, hipotrofia muscular, osteopenia ou mudanças no crescimento de cabelos, unhas e ossos; 3- regional: enfatiza que, na maioria dos casos, a síndrome envolve apenas uma região do corpo, geralmente uma extremidade. Entretanto, pode ocorrer em outra parte ou se espalhar para diferentes áreas do corpo; 4- dor: é considerada essencial para o diagnóstico da síndrome e inclui dor espontânea ou evocada e alodínia (Stanton-Hicks e cols., 1998).

Feliu e Edwards (2010) definiram que os critérios do diagnóstico da SDCR devem incluir: 1- presença de um evento nocivo iniciador (que pode ser traumático ou não); 2- dor continuada, alodínia ou hiperalgesia em que a dor é desproporcional a qualquer lesão conhecida; 3- presença ou história de evidência de edema, anormalidade do fluxo sanguíneo periférico ou atividade sudomotora anormal

na região dolorosa desde o evento iniciador; 4- o diagnóstico é excluído pela existência de condições que possam contribuir para o grau da dor e disfunção.

A SDCR é classificado em tipo I (SDCR-I) e tipo II (SDCR-II): A SDCR-I, chamada de distrofia simpática reflexa até o ano de 1994, é uma neuropatia que pode se desenvolver a partir de um trauma numa extremidade corpórea sem que ocorra lesão nervosa. Ao passo que a SDCR- II, também conhecida como causalgia, difere do tipo I por apresentar lesão nervosa, ainda que parcial, para confirmação do diagnóstico (Feliu e Edwards, 2010).

Alterações tróficas teciduais, vasoconstrição devido a baixas temperaturas afetam membros e extremidades devido a hiperatividade simpática. A sensação dolorosa decorrente da hiperatividade ocorre através dos receptores adrenérgicos expressos nas terminações dos nervos aferentes. O envolvimento do sistema nervoso simpático no estabelecimento da dor crônica na SDCR-I nem sempre é uma regra, mas ocorre em cerca de 50 % dos pacientes, e deve-se a uma exarcebada atividade do sistema nervoso simpático, quadro conhecido como *sympathetically maintained pain* (SMP). Essas observações clínicas corroboram com a hipótese de que depressão, ansiedade e fatores estressores cotidianos possam influenciar no desenvolvimento da SDCR-I através dos seus efeitos na atividade α -adrenérgica (Albrecht e cols., 2006; Kohr e cols., 2009; Bruhel e Carlson, 1992; Shipton, 2009).

2.2 Terapêutica atual

A dor neuropática é uma desordem comum de difícil tratamento, representando um grande desafio para a clínica médica. Desta maneira, faz-se necessário a pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta condição patológica (Chong e cols., 2003).

A via supraespinal (ou descendente) do controle da nocicepção se origina em muitas regiões cerebrais, tais como substância periarquedutal cinzenta (PAG), núcleos medianos da rafe e medula rostral ventromedial (RVM) e possuem papel crítico na modulação da dor crônica e aguda (Heinricher e Ingram, 2008; Heinricher e cols., 2009). O sistema PAG-RVM, importante no comportamento e nos aspectos terapêuticos, é alvo de alguns agentes analgésicos como agentes opióides, inibidores das ciclooxigenases e canabinóides (Hohmann e cols., 2005; Leith e cols., 2007).

Não existe ainda um fármaco ideal para o tratamento da dor neuropática, pois seria um medicamento que integraria respostas analgésicas a ações pró-regenerativas e neuroprotetoras (redução da degeneração). Adicionalmente, os efeitos adversos e a necessidade de vias invasivas de administração têm impedido a aplicação de novos agentes analgésicos na terapêutica clínica (Üçeyler e Sommer, 2006).

Os medicamentos atuais utilizados têm como alvo os diferentes grupos de receptores que culminam em um efeito analgésico sinérgico (Gilron e cols., 2005) porém são pouco efetivos devido a resistência fisiopatológica aos efeitos dos analgésicos, anti-inflamatórios e opióides. Dentre as dificuldades no tratamento da dor neuropática temos: a) curta duração de efeito analgésico na dor persistente, b) tolerância medicamentosa (necessidade de aumentar a dose do medicamento para produzir o mesmo efeito), c) efeitos adversos a longo prazo e d) custo (Abrahams, 2007).

O tratamento atual para a dor neuropática consiste em antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de serotonina, antiepiléticos, corticosteróides, agonistas GABA, antagonistas NMDA, depletors de substância P, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opióides, bloqueador de canal de sódio ou cálcio, anestésicos gerais ou procedimentos cirúrgicos como descompressão do nervo (Chong e cols., 2003).

Os efeitos adversos pelo uso de AINES são agravados em fatores de risco para a indução dos efeitos adpacientes idosos, alcoólatras, além do uso em altas doses agudas, baixas doses a longo prazo ou com agentes anticoagulantes e corticóides (Veldhuyzen, 1997). Os principais efeitos adversos de AINEs incluem ulceração e sangramento do trato gastrointestinal, disfunção hepato-renal, falência de órgãos e reações na pele. Cerca de 1 a 3 % dos pacientes tratados continuamente com esses medicamentos são hospitalizados devido a perfuração e sangramento do trato gastrointestinal. O risco de complicação gastrointestinal aumenta em 5 vezes após o uso de AINEs. Na Alemanha, são estimadas mais de 2000 mortes por ano, causadas pela hemorragia decorrente da terapia com AINEs e um gasto de 128 milhões de euros com drogas gastroprotetoras (Singh e cols., 1998; Steinmeyer, 2000).

O consumo de analgésicos opióides, tais como morfina, tem sido prescritos para pacientes com câncer e dor crônica, porém, novos problemas relacionados a seus efeitos adversos a longo prazo tem restringido o seu uso (Carvalho e Azevedo, 2000). Dois metabólitos da morfina, M3G e M6G formados pela reação de glucuronidação no fígado, estão associados aos efeitos adversos como náuseas, vômitos, sedação. M3G antagoniza o efeito analgésico da morfina. Além disso, pode ocorrer o processo de tolerância à morfina devido a internalização de receptores opióides (Andersen e cols., 2003).

Estudos clínicos mais recentes mostram que antidepressivos aliviam a dor em pacientes com dor neuropática, embora o alívio possa ser parcial ou inexistente. A maioria dos antidepressivos usados no tratamento da dor neuropática são os antidepressivos tricíclicos, que têm sido utilizados neste tipo de dor por mais de 30 anos. No entanto, os antidepressivos tricíclicos estão frequentemente relacionados com os efeitos adversos que limitam o tratamento como, por exemplo, sedação, boca seca,

retenção urinária, constipação e ganho de peso. Os inibidores da recaptação de serotonina são mais bem tolerados, porém, parecem ser menos eficazes do que os antidepressivos tricíclicos (Carter e cols., 2001).

A clonidina (agonista α_2) mostra-se efetivo na neuropatia do câncer quando administrada via neuraxial, no entanto, há poucas evidências de sua ação quando administrada sistemicamente. Os maiores efeitos adversos deste tipo de medicamento são a sedação e a hipotensão. Baclofen, um agonista GABA_B, utilizado na neuralgia do nervo trigêmeo, tem sua utilização limitada devido ao efeito adverso de hipotonia e sedação que compromete seu uso contínuo (Fromm, 1994; Abrahams, 2007).

Como nova opção terapêutica, os óleos essenciais são tradicionalmente utilizados para diversos distúrbios. Óleo de camomila e lavanda são utilizados em pacientes que sofrem de insônia. Óleo de hortelã pimenta e rosmarinus são indicados popularmente para distúrbios digestivos e óleo de eucalipto tem sido utilizado no tratamento de dores musculares. Estudos clínicos com aromaterapia mostram que óleos essenciais apresentam efetivo alívio na dor em pacientes artríticos (Kim e cols., 2005, Gedney e cols., 2004).

O citral é uma mistura de dois terpenos; neral (cis) e geranial (trans), isômeros geométricos de 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-al e é um dos principais componentes de óleos essenciais de espécies vegetais que já possuem atividade sobre o sistema nervoso central e efeito analgésico comprovado tais como os óleos de *Cymbopogon citratus* (Viana e cols., 2000; Carlini e cols., 1986) e *Lippia alba* (Vale e cols., 2002).

3. OBJETIVO:

Em vista do potencial farmacológico dos óleos essenciais e dos efeitos adversos dos medicamentos convencionais, esse projeto propõe dar continuidade aos resultados

prévios obtidos em nosso laboratório com o citral, investigando tanto a atividade analgésica em modelos experimentais agudos e crônicos e seus mecanismos de ação, bem como a avaliação do potencial dessa substância na regeneração nervosa para sua aplicação terapêutica na dor neuropática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados camundongos Swiss machos provenientes do Biotério Anilab, Paulínia-SP e do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Durante o estudo, os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos na temperatura de 20 a 25 °C. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal de acordo com o CEEA do Instituto de Biociências de Botucatu. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor em animais de laboratório (Zimmerman, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito dos tratamentos.

2.2 Substância teste

Em todos os experimentos foi utilizado Citral fornecido comercialmente por Sigma® (Aldrich) e solubilizado em tween 80 a 1 %.

2.3 Avaliação de atividade locomotora e performance motora

Os testes campo aberto (open-field) e barra giratória (rota-rod) foram utilizados neste projeto para excluir ações inespecíficas do citral, tais como efeito relaxante muscular ou sedativo.

2.3.1. Teste do Campo Aberto (*open-field*) (Broadhust, 1957)

O teste do campo aberto foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (*crossing*), foi contado durante 6 minutos. Os animais foram tratados via oral com veículo (tween 80 a 1%), citral 100 ou citral 300 mg/kg, 90 minutos antes da realização do experimento.

2.3.2. Barra Giratória (*Rota-Road*) (Dunham e Miya, 1957)

O aparato da barra giratória (Insight®) consiste em um aparelho contendo uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (rpm), separada em 04 compartimentos permitindo a avaliação simultânea de vários animais. Um dia e meio anterior ao teste, foi realizado a pré-seleção dos camundongos, excluindo os animais que não foram capazes de permanecer equilibrados na barra giratória na velocidade constante de 14 rpm em um período de 60 segundos em pelo menos 3 tentativas consecutivas. Os camundongos selecionados foram submetidos a seções de treinamento na barra giratória durante 3 períodos diferentes (manhã e tarde no dia anterior ao experimento e no período da manhã no dia do experimento), deixando os animais na barra por um período que não excedesse 180 segundos (*cut-off*). Na última seção de treinamento, todos os camundongos selecionados são capazes de permanecer em equilíbrio na barra giratória durante 180 segundos consecutivos. Dessa maneira, a seleção e treinamento prévio dos animais foram procedimentos que garantiram o nivelamento da performance locomotora dos animais a serem observados, garantindo assim, efetiva avaliação da substância teste.

Os animais foram tratados com veículo (via oral, 90 minutos antes do experimento), diazepam 2 mg/kg (via intraperitoneal, 30 minutos antes do experimento) e citral nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg (via oral, 90 minutos antes da avaliação). Os resultados foram expressos pelo tempo de permanência do animal na barra giratória (14 rpm) em um período total de 180 segundos.

2.4. Avaliação da atividade anti-nociceptiva, anti-inflamatória e caracterização dos mecanismos de ação do citral

Com o objetivo de caracterizar a atividade anti-nociceptiva, a curva dose-resposta do citral, bem como os possíveis mecanismos de ação dessa substância, foram utilizados modelos agudos de nocicepção e/ou inflamação induzidos por agentes térmicos (placa quente), agentes químicos (teste da formalina, edema de orelha induzido por xilol ou por ácido araquidônico e nocicepção induzida por forbol miristato acetato), por agonistas (capsaicina, cinamaldeído, mentol, substância P, agonistas glutamatérgicos NMDA e trans-ACPD), por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e por antagonistas serotoninérgicos e opióides, descritos a seguir:

2.4.1. Placa quente (Hot Plate)

Esse modelo foi utilizado para avaliar o possível efeito do citral na nocicepção térmica. Para isso, uma placa de metal insight® foi aquecida e mantida na temperatura constante de $56 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Camundongos foram selecionados no dia anterior ao experimento evitando assim, avaliação com animais muito ou pouco responsivos (foram selecionados animais que respondem ao estímulo térmico no período entre 3 a 10,99 segundos). Os animais são colocados em uma caixa acrílica sobre a placa quente e o tempo que o animal leva até que se obtenha a resposta de lambar, balançar, retirar a pata

ou pular é registrado como tempo de latência ao estímulo térmico (Eddy e Leimback, 1953). Os animais foram tratados com veículo (tween 80 a 1 %, 10 ml/kg, p.o), morfina 5 mg/kg (s.c) ou citral na dose de 100 ou 300 mg/kg (p.o). Os tempos de observação das reações dos animais ao estímulo nociceptivo foram 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. Para evitar danos teciduais na pata do animal, o tempo de permanência máxima do animal na placa quente (*cut-off*) na temperatura de 56°C foi de 20 segundos.

Esse teste foi também aplicado nos animais submetidos à incisão intraplantar (método que será descrito posteriormente), com a placa na temperatura constante de 48°C $\pm$ 1 e foi registrado o tempo de latência em que o animal levou para suspender, lambrar ou retirar a pata operada. O tempo máximo de permanência do animal na placa foi de 2 minutos.

2.4.2. Teste da formalina

O modelo mais específico de dor aguda é caracterizado pelo teste da formalina. Este modelo possui uma resposta bifásica à dor: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente 5 min da administração do agente nociceptivo 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30 min após administração de formalina e permanece até cerca de 60 min após a injeção intraplantar de formalina. A resposta do animal nesta fase é indicativa de dor inflamatória. Este experimento foi baseado nas descrições de Hunskaar e Hole (1987), com algumas modificações. Foi utilizada uma câmara de observação, que consiste em um funil de vidro com 20 cm de diâmetro sobre um espelho. Cada camundongo foi previamente colocado no funil por 20 min antes do tratamento para permitir aclimação ao novo ambiente. Os camundongos foram pré-tratados oralmente com veículo (10 ml/kg) e citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg. Após uma hora, foi administrada por injeção intraplantar, 20 µl de solução de formalina 2,7 % (1% de formaldeído) em tampão fosfato na pata traseira direita.

Imediatamente depois da injeção de formalina, os animais foram observados até 30 min após a administração do agente nociceptivo. O tempo (em segundos) que o camundongo lambeu a pata foi registrado e considerado como indicativo de dor.

2.4.2.1. Participação do sistema serotoninérgico na anti-nocicepção (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações)

Para avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade anti-nociceptiva do citral, camundongos foram pré-tratados com WAY100635 0,1 mg/kg i.p (antagonista 5 HT_{1A}), ketanserina 1 mg/kg i.p (antagonista 5 HT_{2A}) , ondansetron 0,5 mg/kg i.p (antagonista 5 HT_{3A}) 30 min antes do tratamento oral com o citral (100 mg/kg, p.o, dose de citral que apresenta maior atividade nos modelos de nocicepção crônica e lesão aguda por incisão) no teste da formalina como descrito anteriormente. Através deste modelo experimental e foi possível avaliar a participação do sistema serotoninérgico bem como o envolvimento dos diferentes tipos de receptores envolvidos na nocicepção.

2.4.2.2. Participação de receptor opióide na anti-nocicepção (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações)

Para avaliar a participação de receptores opióides na atividade anti-nociceptiva do citral, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista de receptor opióide) 1 mg/kg ou 2mg/kg (i.p), 30 min antes do tratamento oral com o citral 100 mg/kg, no teste da formalina como descrito anteriormente. Morfina 2,5 mg/kg (s.c) foi utilizada para o controle da reversão da anti-nocicepção.

2.4.2.3. Participação do óxido nítrico na anti-nocicepção (Santos e cols., 1999 e Santos e cols., 2005 com modificações)

Com a finalidade de investigar o papel do óxido nítrico na anti-nocicepção causada pelo citral, camundongos foram pré-tratados com salina (5 ml /kg, i.p) ou l-arginina (600 mg /kg, i.p., um precursor do óxido nítrico). Após 30 minutos, os animais receberam citral (100 mg kg, p.o), N ω -nitro-l-arginina (l-name, 75 mg/kg, i.p., um inibidor da síntese de óxido nítrico) ou veículo (10 ml/kg, p.o). A resposta nociceptiva induzida pela formalina foi registrada 60, 30 e 60 min depois da administração de citral, l-name ou veículo, respectivamente.

2.4.3. Indução de nocicepção pelo glutamato (Beirith e cols., 2002 com modificações)

Com o intuito de avaliar o envolvimento da ação do citral com o sistema glutamatérgico periférico, 30 μ mol de glutamato foram administrados por injeção intraplantar em um volume final de 20 μ l. Os animais tratados oralmente com veículo e citral (100 mg/kg) foram observados por 15 min seguidos após a injeção. A quantidade de tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi considerada como indicativo de dor.

2.4.4. Nocicepção induzida por forbol miristato acetato (PMA) (Siebel e cols., 2004; com modificações)

Com o intuito de avaliar o envolvimento da proteína quinase C na ação anti-nociceptiva do citral, 20 μ l de PMA, um ativador de proteína quinase C (100 pmol/pata preparada em salina) foram injetados na superfície ventral plantar da pata direita dos camundongos de maneira similar ao descrito previamente por Siebel e cols., 2004. Os animais foram observados individualmente no período de 15 a 45 min após a injeção intraplantar de PMA. A quantidade de tempo em segundos que o animal lambe a pata

foi registrada no cronômetro e considerada como indicativo de nocicepção. Os camundongos foram tratados com citral (100 mg/kg, p.o) ou veículo (10 ml/kg, p.o), 60 min anteriores a injeção de PMA.

2.4.5. Nocicepção induzida por mentol

Com o intuito de avaliar o envolvimento de receptores TRPM8 no mecanismo de ação anti-nociceptivo do citral, um volume de 20 µl de mentol (2,4 µmol/pata preparada em DMSO) foi injetado na superfície ventral plantar da pata direita dos camundongos (Córdova e cols., 2004 com modificações). Os camundongos foram observados individualmente durante 20 min após a injeção de mentol. A quantidade de tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi registrada e considerada indicativa de nocicepção. Os camundongos foram tratados com citral (100 mg/kg, p.o) ou veículo (10 ml/kg, p.o), 60 min antes da injeção de mentol.

2.4.6. Nocicepção induzida por cinamaldeído (Bautista e cols., 2006)

Para avaliar o envolvimento dos receptores TRPA1 no mecanismo de ação do citral, 20 µl de cinamaldeído (30 nmol/pata preparado em salina) foram injetados na superfície ventral da pata direita. Os camundongos foram observados individualmente durante 5 minutos após a injeção de cinamaldeído (Andrade e cols., 2008). A quantidade de tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi registrada e considerada indicativa de nocicepção. Os camundongos foram tratados com citral (100 mg/kg, p.o) ou veículo (10 ml/kg, p.o), 60 min antes da injeção de cinamaldeído.

2.4.7. Nocicepção induzida por capsaicina (Sakurada e cols., 1992)

Com a finalidade de avaliar o envolvimento de receptores TRPV1 na ação nociceptiva do citral, 20 µl de solução de capsaicina (2 µg/pata preparado em salina e

10% de DMSO) foi injetada na superfície ventral da pata direita. Os camundongos foram observados individualmente durante 5 min após a injeção de capsaicina. A quantidade de tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi registrada e considerada como indicativo de nocicepção. Os camundongos foram tratados com citral (100 mg/kg, p.o) ou veículo (10 ml/kg, p.o), 60 min antes da injeção de capsaicina.

2.4.8. Nocicepção induzida por injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos, substância P, capsaicina, e TNF- α

Com o intuito de evidenciar os mediadores relacionados com a ação nociceptiva do citral em nível central, agonistas glutamatérgicos, substância P (SP), capsaicina e TNF- α foram administrados por via intratecal. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Gadotti e cols., (2006). As administrações foram realizadas com o camundongo acordado, contidos manualmente, e uma agulha adaptada a uma microseringa de 25 μ L (Hamilton) foi inserida entre as vértebras L5-L6 dentro do espaço subdural, utilizando o método descrito por (Hylden e Wilcox, 1980). As injeções foram administradas durante o período de 5 segundos, e a resposta nociceptiva foi avaliada após a administração de NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II, 50 nmol/sítio), substância P (agonista preferencial de receptores NK1, 100 pmol/sítio), capsaicina (agonista de receptores TRPV1, 100 pmol/sítio) e TNF- α (0,1 pg/sítio) em um volume final de 5 μ l por sítio. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas posteriores, abdômen ou cauda foi cronometrado e registrado como indicativo de nocicepção. Neste modelo, uma mordida é definida como um simples movimento da cabeça em direção ao abdômen ou membros posteriores, resultando no contato do focinho do animal com o órgão alvo.

Os animais foram tratados via oral com veículo (tween 80 a 1%) ou 100 mg/kg de citral. O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado de acordo com o tempo padronizado para cada agonista: NMDA: 5 min; trans-ACPD: 15 min; SP: 6 min; capsaicina: 6 min; TNF- α : 15 min.

2.4.9. Avaliação do efeito do citral na inflamação neurogênica no modelo de edema de orelha induzido pelo xilol

O xilol possui ação pró-inflamatória aguda de origem predominantemente neurogênica mediada pelos neurônios sensíveis a capsaicina. Há evidências do envolvimento da substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na ativação das fibras sensoriais pelo xilol. Nesse modelo experimental, substância P provoca extravasamento de plasma (e consequentemente edema) através da ativação de receptores NK1 (neurocininas) nas células do endotélio vascular, enquanto que CGRP potencializa o efeito da substância P através da indução de vasodilatação (Geppetti e cols., 1996).

Para indução de edema de orelha, 40 μ l de xilol foram aplicados na superfície da orelha esquerda dos camundongos (20 μ l na face anterior da orelha, 20 μ l na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os animais foram tratados 90 minutos antes da indução do edema com veículo (p.o), citral 100 ou 300 mg/ kg (p.o). Animais tratados com dexametasona (5 mg/kg, i.p), 2 horas antes da indução do edema, foram utilizados como controle positivo do experimento. Uma hora após a indução do edema pela aplicação tópica de xilol, os camundongos foram mortos e uma secção circular (8 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um *puncher* (perfurador).

O edema foi expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita (Swingle e cols., 1981 com modificações).

2.4.10. Avaliação do efeito do citral no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (Young e cols., 1983)

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do citral e seu envolvimento na cascata do ácido araquidônico, 2 mg de ácido araquidônico foram aplicados na superfície da orelha esquerda dos camundongos (10 µl na face anterior da orelha, 10 µl na face posterior) para indução de edema de orelha. A orelha direita foi utilizada como controle. Os animais foram tratados 90 minutos antes da indução do edema com veículo (p.o), citral 100 ou 300 mg/ kg (p.o). Animais tratados com dexametasona (5 mg/kg, i.p), 2 horas antes da indução do edema, foram utilizados como controle positivo do experimento. Uma hora após a indução do edema pela aplicação tópica de ácido araquidônico, os camundongos foram mortos e uma secção circular (8 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um *puncher* (perfurador).

O edema foi expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita.

2.5. Avaliação do citral em modelos de aplicabilidade terapêutica

Na proposta de avaliar o potencial do citral para aplicação na terapêutica clínica foram utilizados três diferentes modelos de nocicepção em camundongos: 1) lesão incisional (que caracteriza a dor aguda pós-operatória em humanos) , 2) lesão pós isquemia e reperfusão (que caracteriza a Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I em humanos) e 3) constrição parcial do nervo ciático (modelo de dor neuropática periférica). Após a indução das lesões, os camundongos foram submetidos a tratamentos prolongados com citral e avaliações diárias do limiar sensorial mecânico

através do filamento de von Frey (0.4g). Esses modelos animais caracterizam processos patológicos comumente registrados na clínica médica e que ainda representam grande desafio no tratamento da dor aguda e crônica, tais como dor pós-operatória, síndrome da dor complexa regional-I e dor neuropática decorrente de lesão ou compressão nervosa. Os procedimentos experimentais estão descritos detalhadamente a seguir:

2.5.1. Alodínia mecânica (von Frey)

Para analisar o limiar sensorial mecânico foi registrado a frequência de resposta ao filamento de von Frey nos modelos de lesão incisional, lesão pós isquemia-reperfusão e constrição parcial do nervo ciático. A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de von Frey (0,4 g) (VFH, Stoelting, Chicago, USA) foi utilizada como indicativo de resposta, de maneira similar ao realizado por Baggio e cols., (2010). No dia anterior a indução da lesão, os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal (pontuado no eixo da abcissa como “pré”). Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta abaixo de 20% foram utilizados para os procedimentos de indução de nocicepção crônica.

O teste foi realizado utilizando-se de uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm (figura 3 A). Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (Pitcher e cols., 2004) (figura 3 B). Antes das avaliações, os animais foram previamente ambientados na caixa acrílica durante o tempo mínimo de 15 min ou até o término do comportamento exploratório do animal.

Após a indução da lesão, o filamento de von Frey (0,4g) foi aplicado na pata lesada, atendendo a pelo menos 3 critérios: 1) aplicação feita perpendicularmente à

superfície plantar com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; 2) a avaliação foi feita apenas quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; 3) a resposta de retirada foi considerada apenas quando o animal remove totalmente a pata da tela de apoio.



Figura 3: Plataforma de arame para avaliação dos animais através dos filamentos de von Frey. A) Plataforma apoiada na mesa de observação B) visão ampliada: caixa de acrílico compartimentalizada para observação individual dos camundongos Fotografia: Catarine Nishijima (2011).

2.5.2. Avaliação do efeito do citral na dor aguda pós-operatória (DPO) em modelo de lesão incisional em camundongos

Com o intuito de avaliar o efeito do citral na dor pós-operatória aguda, foi utilizado o modelo de lesão incisional seguido de tratamento prolongado com o citral. A incisão plantar foi realizada em camundongos como descrito por Pogatzki e Raja (2003). Os animais foram anestesiados com 1–2% de isoflurano aplicado através de uma máscara nasal (figuras 4 A e B). Após a preparação estéril da pata traseira direita, uma incisão de 5 mm longitudinal foi feita através da pele e fáscia da parte plantar do pé com um bisturi de lâmina número 11. A incisão teve início a 2 mm da extremidade proximal do calcanhar em direção aos dedos dos pés. O músculo plantar foi elevado com um fórceps, mantendo a origem e inserção do músculo intacto. Após a incisão, a

pele foi suturada com um fio de nylon 6-0 e a sutura foi coberta com 10% de solução povidine-iodo® (figura 5).

No dia seguinte, os animais submetidos à lesão incisional foram selecionados, descartando os camundongos que apresentaram frequência de resposta inferior a 60 % ao estímulo mecânico aplicado pelo filamento de von Frey. A frequência de resposta dos animais selecionados foram registrados e pontuados no gráfico no eixo da abcissa como “pós”.

Em seguida, os animais foram distribuídos de forma homogênea de acordo com suas frequências de resposta, evitando assim, a formação de grupos tendenciosos que apresentem maior ou menor frequência de resposta anterior ao tratamento. Dessa maneira, os camundongos selecionados foram distribuídos homogeneamente e receberam os respectivos tratamentos orais: veículo (tween 80 a 1%), citral nas doses de 2.5, 25, 100 ou 300 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, iniciou-se a avaliação dos animais, que foi realizada de hora em hora em um período de 4 horas (*time-course*). Através da avaliação *time-course* determina-se a dose e o tempo após a administração em que o citral apresenta maior efeito no modelo de lesão incisional para assim, serem utilizados durante os 06 dias subsequentes de avaliação.

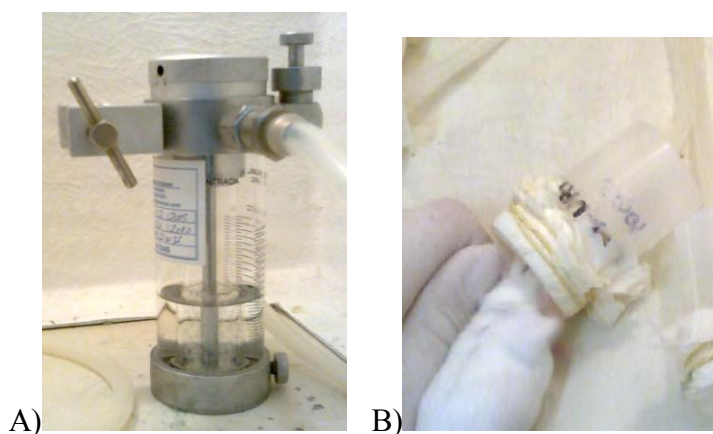


Figura 4: Sistema de anestesia por isoflurano A) vaporizador contendo anestésico líquido acoplado ao balão de oxigênio com fluxo regulável. B) Máscara de anestésico colocada na região nasal do camundongo. Fotografia: Catarine Nishijima (2011)

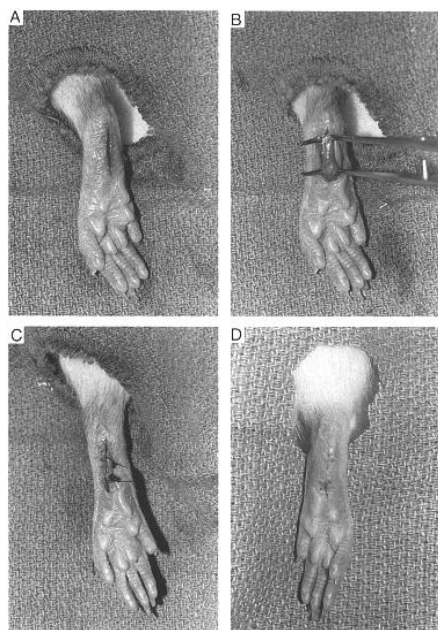


Figura 5 – Fotografias de diferentes estágios do procedimento cirúrgico (padronização em ratos) A) incisão longitudinal de 1 cm feita através da pele e fáscia iniciando a 0,5 cm da extremidade proximal do calcanhar se estendendo pela linha média do pé. B) O músculo plantar é elevado e feito uma incisão longitudinal. C) depois da hemostase a incisão é suturada. D) cicatrização, 5 dias depois da incisão. Fonte: Brenmann e cols. , 1996.

2.5.3. Avaliação do efeito do citral na síndrome da dor complexa regional do tipo I em modelo crônico de lesão por isquemia e reperfusão (DCIR)

Com o intuito de avaliar o efeito do citral na síndrome da dor complexa regional do tipo I (SDCR-I) foi realizado o modelo crônico de lesão por isquemia e reperfusão seguido de tratamento prolongado com o citral. Para realização da isquemia, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg) (Quintão e cols., 2006). Após a verificação do estado de consciência do animal, foi posicionado um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 marca: Uniden) proximal a articulação do tornozelo direito de modo a fazer um torniquete. Experimentos prévios indicam que aproximadamente 40% dos animais não desenvolvem alodínia mecânica aos filamentos de von Frey mesmo após o

estabelecimento da lesão isquêmica. Portanto, foram utilizados 15 animais por grupo no para que em média 8 a 10 animais por grupo possam ser avaliados posteriormente.

Os animais foram mantidos anestesiados durante o período de 3 horas com reforços anestésicos de 20% da dose inicial (se necessário). Após 3 horas, o anel foi cortado permitindo assim a reperfusão da pata. Depois do corte do anel, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a locomoção dentro da caixa, voltando em seguida para o biotério do laboratório. No dia seguinte, os animais foram selecionados, descartando os camundongos que apresentaram frequência de resposta inferior a 60 % ao estímulo mecânico aplicado pelo filamento de von Frey. A frequência de resposta dos animais selecionados foram registrados e pontuados no gráfico no eixo da abcissa como “pós”. No segundo dia após a lesão por isquemia-reperfusão (fase inicial), os animais foram distribuídos de forma homogênea de acordo com suas frequências de resposta, evitando assim, a formação de grupos tendenciosos que apresentem maior ou menor frequência de resposta anterior ao tratamento.

Dessa maneira, os camundongos selecionados foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e receberam os respectivos tratamentos orais: veículo (tween 80 a 1%), citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, iniciou-se a avaliação dos animais, que foi realizada de hora em hora durante 4 horas ou até a substância teste perder o seu efeito (*time-course*). Através da avaliação *time-course* pode-se determinar a dose e o tempo em que o citral apresentou maior atividade no modelo de lesão pós isquemia-reperfusão na fase inicial.

Mesmo procedimento (seleção dos animais, distribuição, registro das respostas ao filamento de von Frey antes dos tratamentos e avaliação *time-course*) foi realizado no 7º dia após a lesão por isquemia-reperfusão (fase tardia). A fase tardia desse modelo caracteriza a dor neuropática crônica na síndrome da dor complexa regional do tipo I.

Através da avaliação time-course determinou-se a dose e o tempo de administração mais efetivos para a ação do citral, assim, os registros do estímulo mecânico ao filamento de von Frey e o tratamento prolongado com o citral ou veículo prosseguiram por mais 8 dias (8º dia ao 15º dia após lesão por isquemia-reperfusão). Houve suspensão do tratamento prolongado com o citral no 12º e 13º dia após a lesão isquemia-reperfusão, retomando o tratamento no 14º dia.

2.5.4. Modelo crônico de dor neuropática induzida pela constrição parcial do nervo ciático (CPNC)

Camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano, como descrito anteriormente. Após a verificação do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área a ser operada (coxa direita). Em seguida, fez-se uma incisão curvilínea no hemicorpo direito do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplíteia, ao nível da inserção dos músculos ísquio-tibiais. A exposição do nervo ciático é alcançada após a divulsão dos músculos semitendinoso e reto femoral e então foi realizada incisão no membro inferior direito a fim de expor o nervo ciático (Bennett e Xie, 1988). Em seguida, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi amarrado com o auxílio de fio de sutura. Em camundongos falso-operados (sham), o nervo ciático foi exposto utilizando o mesmo procedimento cirúrgico, mas sem sofrer constrição. A divulsão muscular foi reparada com 2 pontos de sutura com fio absorvível e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada acesa como fonte de calor até retornarem a se locomoverem pela caixa, retornando então ao biotério do laboratório.

Uma semana depois, os animais foram selecionados, descartando os camundongos que apresentaram frequência de resposta inferior a 60 % ao estímulo

mecânico aplicado pelo filamento de von Frey. A frequência de resposta dos animais selecionados foram registrados e pontuados no gráfico no eixo da abcissa como “pós”.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos de forma homogênea de acordo com suas frequências de resposta, evitando assim, a formação de grupos tendenciosos que apresentem maior ou menor frequência de resposta anterior ao tratamento:

- Grupo 1 (Sham) - Animais operados sem constrição do nervo ciático e que não receberam tratamento (falso-operado) usado como controle (da cirurgia);
- Grupo 2 (Naive) - Animais não-operados que não foram submetidos a constrição do nervo ciático, este grupo também não recebeu tratamento;
- Grupo 3 - Animais operados e submetidos a constrição do nervo ciático e tratados com veículo (tween 80 a 1 %);
- Grupos 4, 5 e 6 - Animais operados e submetidos a constrição do nervo ciático e tratados via oral com citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg.

Uma hora após os tratamentos, iniciaram-se as avaliações dos animais, que foram realizadas de hora em hora durante 4 horas (*time-course*). Através da avaliação *time-course* determinou-se a dose e o tempo que o citral apresenta maior atividade no modelo de constrição parcial do nervo ciático (caracterizando a dor crônica neuropática). Durante 09 dias subsequentes à constrição parcial do nervo, os camundongos foram avaliados e tratados diariamente com veículo (p.o) ou citral 100 mg/kg (p.o) (gráfico constrição parcial diário). Nos 6º e 7º dia o tratamento com o citral foi suspenso, retornando no 8º dia.

2.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posterior de Dunnett ou teste t não-pareado para comparação entre 2 grupos, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$. Para análise dos dados de frequência de retirada da pata na alodínia mecânica foi empregado a Análise de Variância ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Foi utilizado o software Graph Pad Prism 5.01.

3. RESULTADOS:

No teste da formalina, citral na dose de 300 mg/kg (p.o) apresentou atividade anti-nociceptiva tanto na fase neurogênica como na fase inflamatória. A substância perde seu efeito na fase neurogênica quando a dose foi reduzida para 100 mg/kg, no entanto, sua ação na fase inflamatória se manteve. Já a administração oral do citral na dose de 25 mg/kg não demonstra atividade em ambas as fases (gráficos 1 e 2).

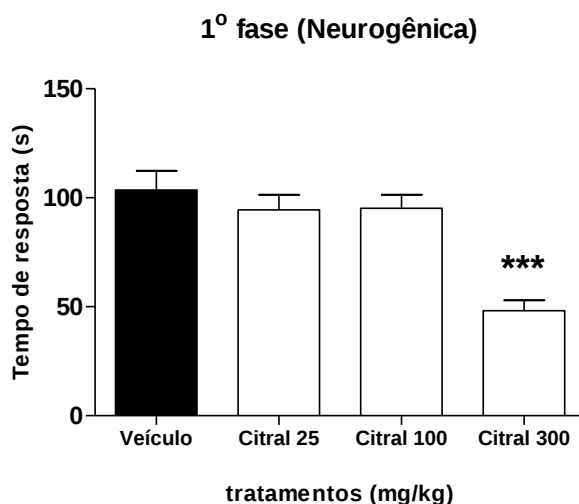


Gráfico 1: Efeito da administração oral do citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg, na fase neurogênica no modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

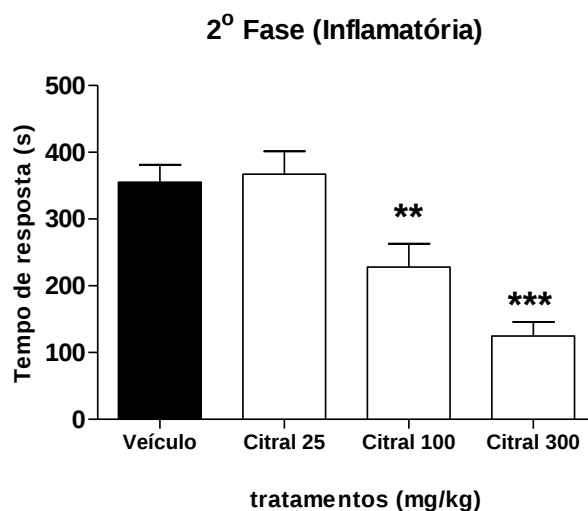


Gráfico 2: Efeito da administração oral do citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg, na fase inflamatória no modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

O gráfico 3 mostra o efeito do citral no aumento do tempo de latência de retirada da pata na placa quente (56° C) apenas na maior dose. O efeito anti-nociceptivo nesse modelo foi restrito apenas aos 90 min após a administração da substância. Citral não apresentou atividade nesse modelo aos 30, 60 e 120 min após a sua administração (dados não mostrados).

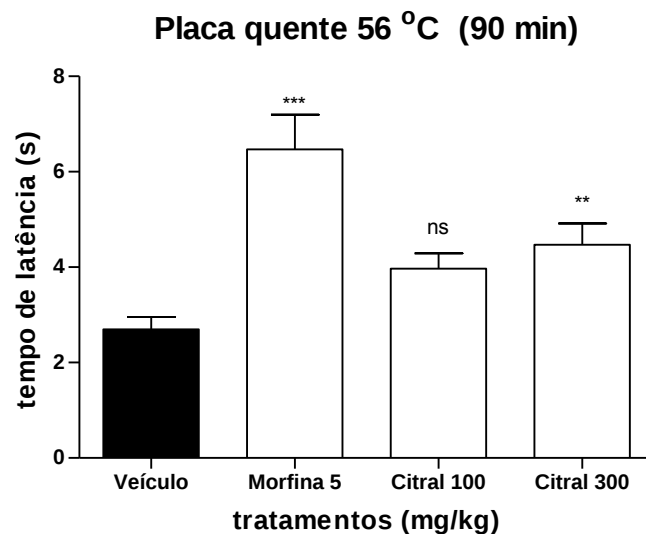


Gráfico 3: Efeito da administração oral de citral nas doses de 100 ou 300 mg/kg na nocicepção térmica induzida pela placa quente (56° C) em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. ns: diferença não-significativa. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Levando-se em conta o tempo de ação do citral (90 min após a administração) no modelo da placa quente, avaliamos o efeito do citral no edema de orelha induzido pelo xilol nas doses de 100 ou 300 mg/kg, 90 min após sua administração oral. Assim como no modelo da placa quente, apenas a dose de 300 mg/kg apresentou significativa atividade anti-nociceptiva. Os resultados estão dispostos no gráfico 4.

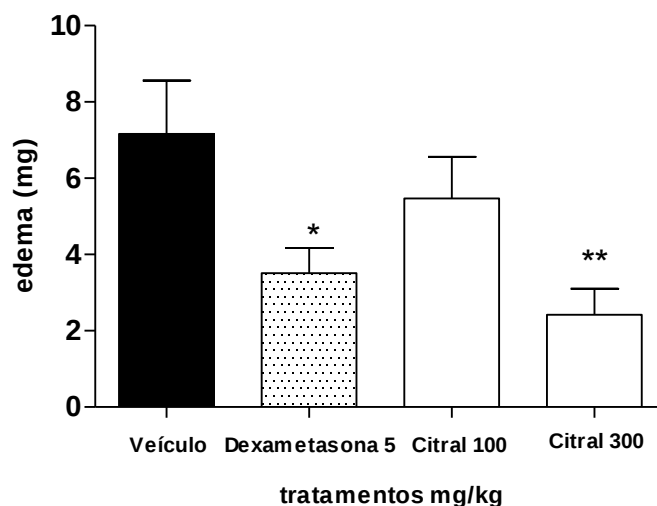


Gráfico 4: Efeito da administração oral de citral nas doses de 100 ou 300 mg/kg no edema de orelha induzido pelo xilol em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Da mesma maneira, avaliamos a atividade anti-edematogênica do citral frente a indução do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico (gráfico 5). Ambas as doses testadas não foram capazes de inibir o processo edematogênico.

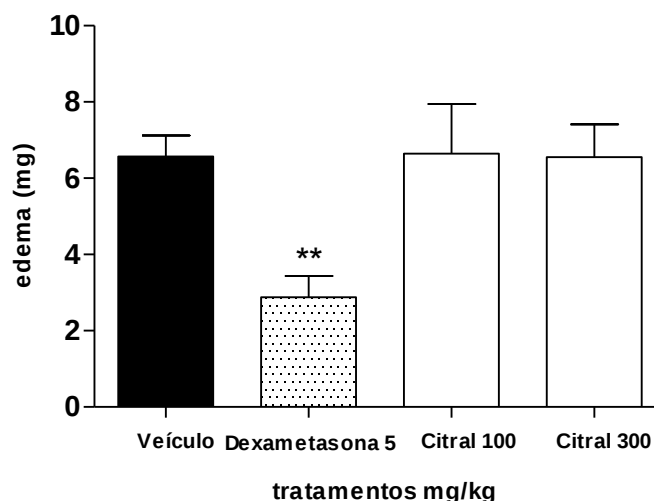


Gráfico 5: Efeito da administração oral de citral nas doses de 100 ou 300 mg/kg no edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. ** $p < 0,01$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

O efeito do citral (100 ou 300 mg/kg, p.o) na performance locomotora foi realizada através dos modelos de campo aberto e barra giratória, 90 minutos após sua administração por via oral. Em ambos os modelos, nenhuma das doses do citral alterou a performance locomotora dos animais (gráficos 6 e 7). Dessa forma então, realizou-se a avaliação do efeito do citral em modelos que caracterizam quadros de hipernocicepção recorrentes na clínica.

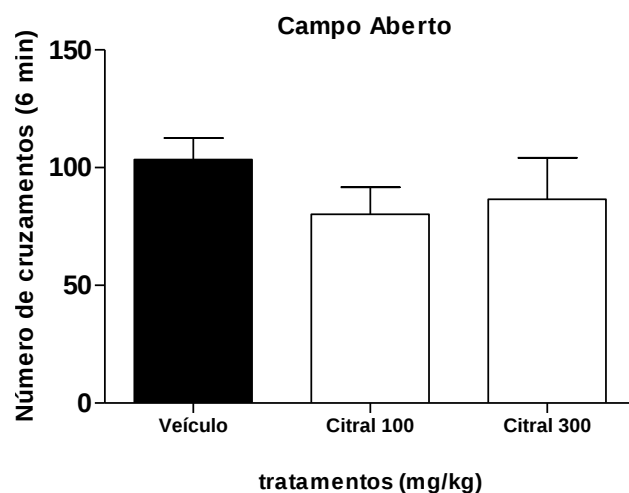


Gráfico 6: Efeito da administração oral de citral nas doses de 100 ou 300 mg/kg no campo aberto em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

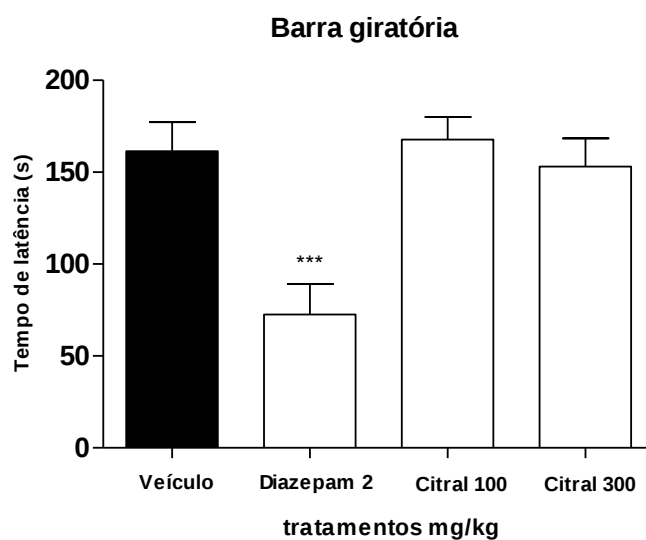


Gráfico 7: Efeito da administração oral de citral nas doses de 100 ou 300 mg/kg na barra giratória em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunett. ** $p < 0,01$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

No modelo de incisão intraplantar, verificamos que todas as doses do citral, exceto a dose de 2,5 mg/kg, inibiu a alodínia mecânica durante 3 horas após a administração. Na dose de 300 mg/kg a ação anti-nociceptiva do citral foi alcançada apenas na primeira hora, perdendo bruscamente seu efeito a partir da segunda hora. O efeito máximo foi obtido na dose de 100 mg/kg, duas horas após o tratamento (gráfico 8).

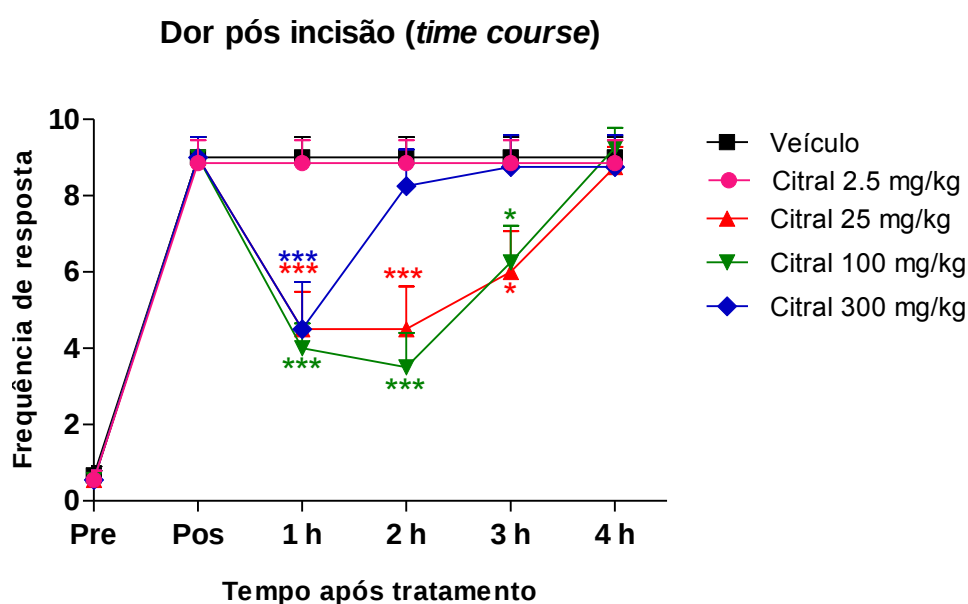


Gráfico 8: Efeito da administração oral de citral nas doses de 2,5, 25, 100 ou 300 mg/kg na dor pós operatória durante 4 horas no modelo de nocicepção induzida por incisão intraplantar em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Um dia após a indução da dor pós operatória, os animais foram submetidos à placa quente na temperatura de 48° C. Para tal análise, utilizamos apenas a melhor dose efetiva (100 mg/kg). Observamos que citral aumentou o tempo de latência para a resposta de retirada de pata, em relação ao grupo veículo-operado, para médias similares ao grupo naíve (gráfico 9).

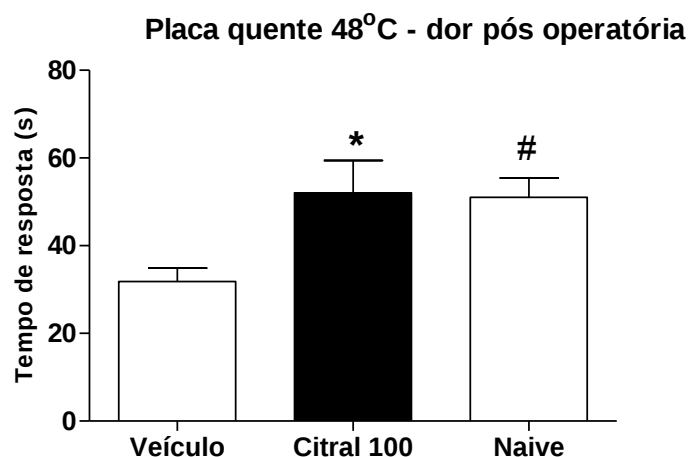


Gráfico 9: Efeito da administração oral de citral 100 mg/kg após um dia a indução da dor pós-operatória no modelo de placa quente em camundongos. ANOVA seguido de teste Dunnett. * $p < 0,05$, # grupo naíve com diferença estatística significativa em relação ao controle (veículo-operado). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Prosseguimos a avaliação do citral (100 mg/kg, p.o) na dor pós-operatória, por mais 6 dias consecutivos. As avaliações da nocicepção foram realizadas duas horas após a administração. O tratamento dos animais com o citral promoveu diminuição significativa da alodinia em relação ao controle até 4 dias após a indução da lesão pela incisão. Entretanto, há uma diminuição natural da frequência de resposta ao estímulo mecânico, em decorrência da cicatrização da pata (gráfico 10).

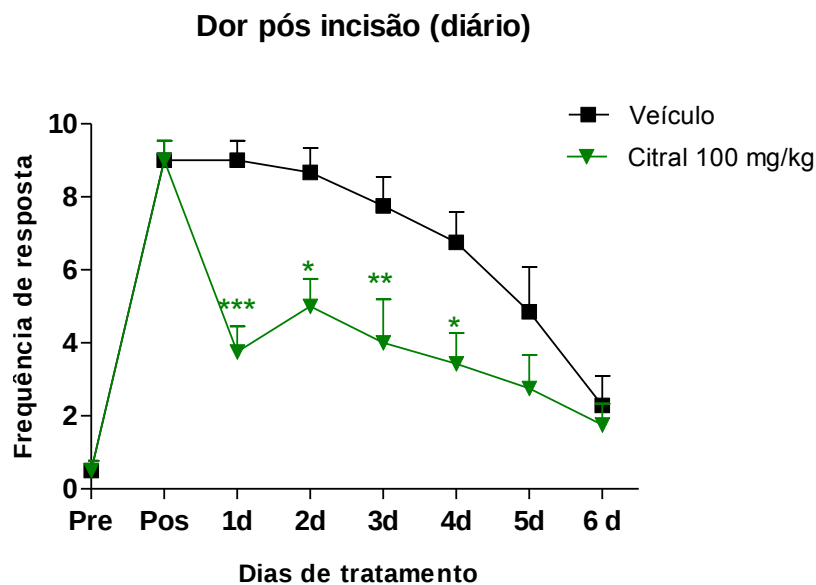


Gráfico 10: Efeito da administração oral de citral 100 mg/kg na dor pós operatória durante 06 dias no modelo de nocicepção induzida por incisão intraplantar em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Citral não apresentou efeito na alodínia mecânica na fase inicial (2º dia após a lesão) no modelo de lesão induzida por isquemia e reperfusão em nenhuma das doses testadas (gráfico 11). Entretanto, na fase tardia (7º dia após a indução da lesão), citral na dose de 100 mg/kg administrado oralmente foi capaz de diminuir a alodínia mecânica durante 3 horas após sua administração. As doses de 25 mg/kg e 300 mg/kg não apresentaram atividade (gráfico 12).

Dor Pós Isquemia-Reperusão 2º dia

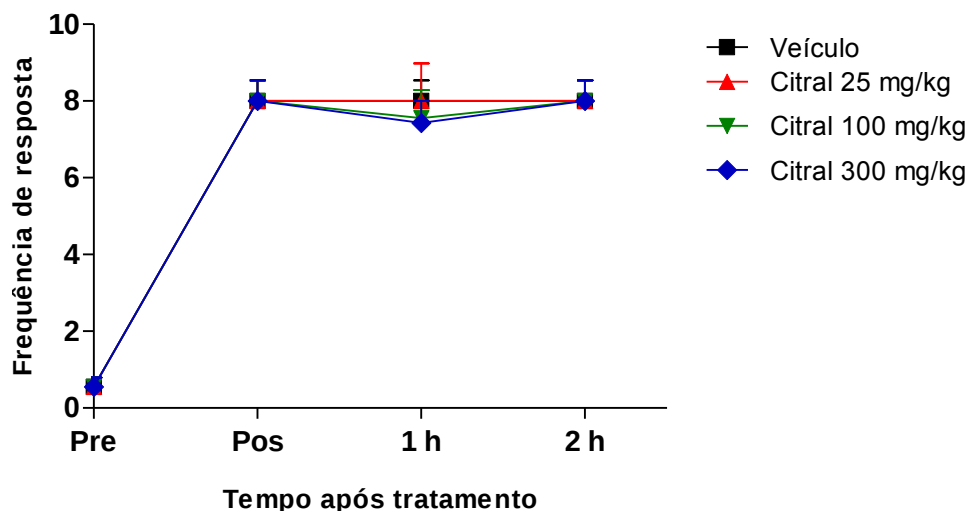


Gráfico 11: Efeito da administração oral de citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg na Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I no modelo de nocicepção induzida por isquemia e reperusão (fase inicial, 2º dia) em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Dor Pós Isquemia-Reperusão 7º dia

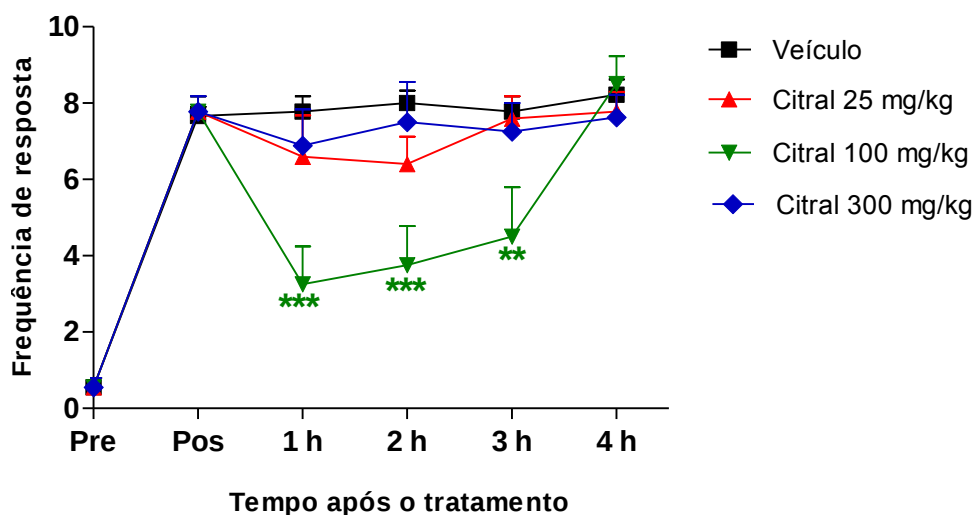


Gráfico 12: Efeito da administração oral do citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg na Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I no modelo de nocicepção induzida por isquemia e reperusão (fase tardia, 7º dia) em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. *** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Assim, observou-se o efeito do citral por mais 09 dias, através do tratamento diário com o citral (100 mg/kg), e avaliação dos camundongos ao estímulo mecânico pelos filamentos de von Frey uma hora após o tratamento (gráfico 13). Quando o tratamento foi suspenso no 6º e 7º dia após o início do tratamento, citral deixa de exercer efeito na alodínia mecânica. Entretanto, após o retorno do tratamento, citral continua exercendo atividade, indicando que citral não induz tolerância.

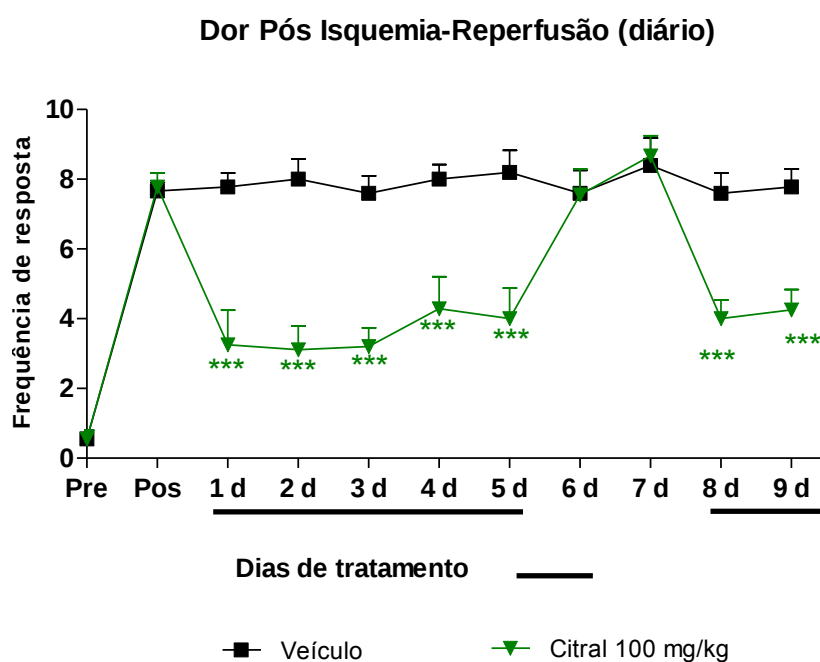


Gráfico 13: Efeito da administração oral de citral na dose de 100 mg/kg na Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I no modelo de nocicepção induzida por isquemia e reperfusão (na fase tardia, durante 9 dias) em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

O gráfico 14 mostra a ação do citral na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático e novamente, citral na dose de 100 mg/kg apresentou melhor atividade em relação as outras doses testadas. Citral na dose de 300 mg/kg possui atividade apenas uma hora após sua administração perdendo bruscamente seu efeito a partir da segunda hora.

Constrição parcial do nervo ciático (*time-course*)

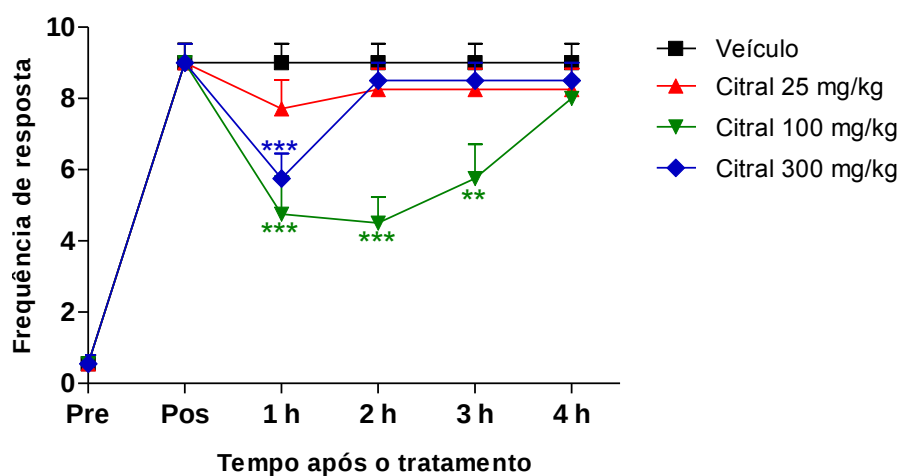


Gráfico 14: Efeito da administração oral de citral nas doses de 25, 100 ou 300 mg/kg na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático durante 4 horas em camundongos. ANOVA seguido de teste Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Prosseguimos então a avaliação por mais 09 dias, com o tratamento prolongado com citral (100 mg/kg) e observações foram feitas 2 horas após o tratamento. O grupo de animais tratados passa a apresentar resposta hipernociceptiva quando suspendemos o tratamento e volta a reduzir a resposta a partir do 8º dia após o início do tratamento, indicando que citral não induziu tolerância (gráfico 15).

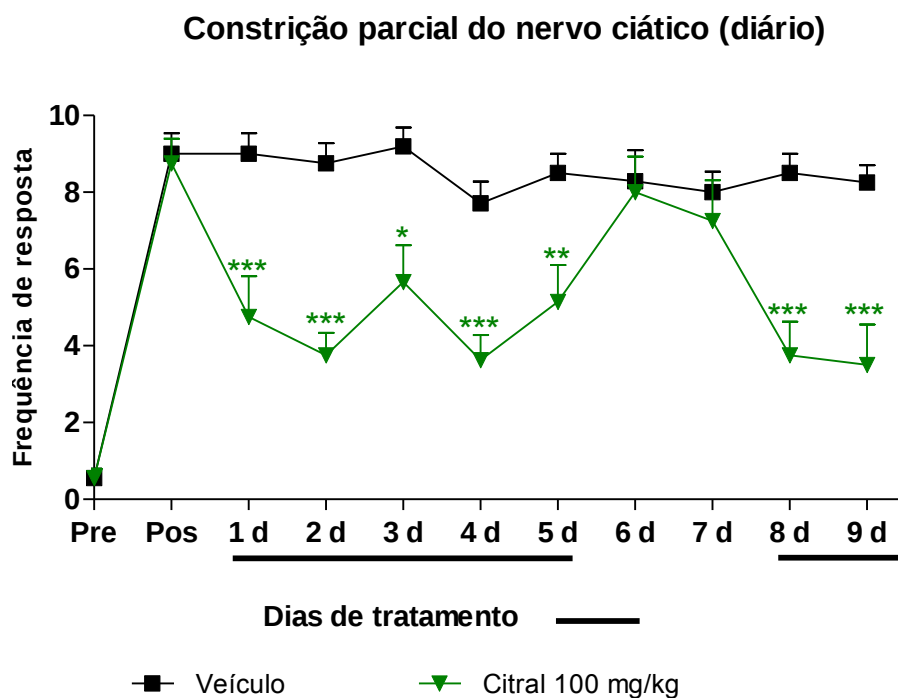
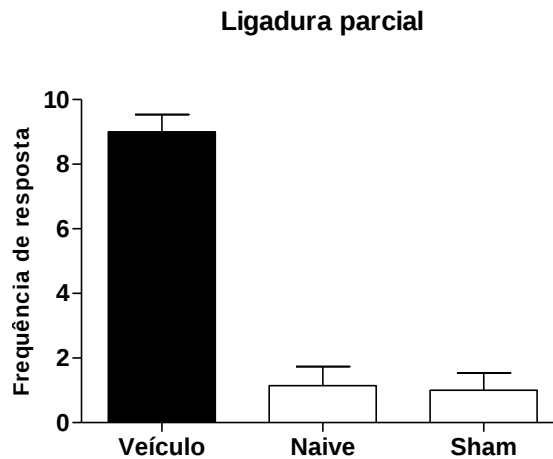


Gráfico 15: Efeito da administração oral de citral na dose de 100 mg/kg na neuropatia induzida por constrição parcial do nervo ciático em camundongos durante 9 dias. ANOVA seguido de teste Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Os animais não-operados (naive) e falso-operados (sham) também foram avaliados a fim de garantir que a resposta de hipernocicepção provocada pelo filamento de von Frey ocorre devido ao procedimento de constrição do nervo, bem como para constatar que o estímulo aplicado pelo filamento é inócuo em animais não lesionados (gráfico 16).



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Gráfico 16: Registro das frequências de respostas dos grupos controle (veículo), naive (não-operado) e sham (falso-operado) no modelo de constrição parcial do nervo ciático.

Cital (100 mg/kg, p.o) foi capaz de diminuir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (gráfico 17), bem como a nocicepção induzida pela injeção intratecal de agonistas de receptores glutamatérgicos metabotrópicos e ionotrópico, trans-ACPD e NMDA, respectivamente (gráfico 18).

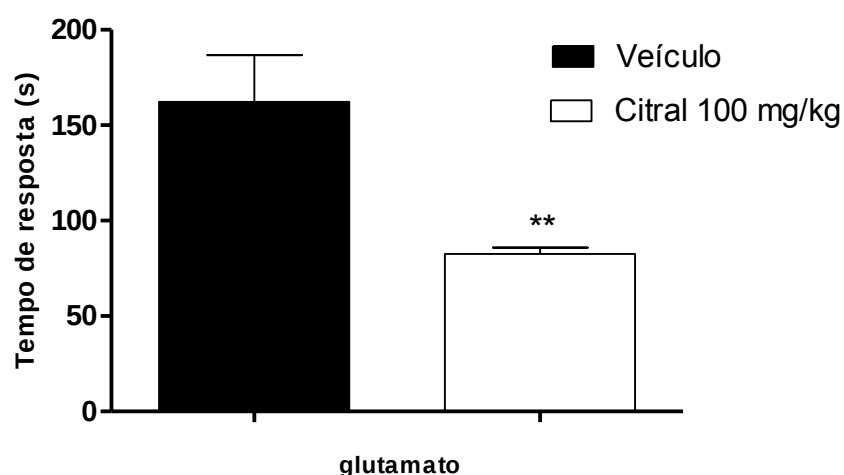


Gráfico 17: Efeito da administração oral do citral na dose de 100 mg/kg na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. ANOVA seguido de teste t. ** $p < 0,01$. Tratamento em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

O comportamento *bitting* induzido pela injeção intratecal de substância P (SP) e TNF- α é significativamente diminuído pelo tratamento oral com o citral na dose de 100 mg/kg (p.o). Entretanto, citral potencializa o comportamento de *bitting* provocado pela injeção intratecal de capsaicina (gráfico 18).

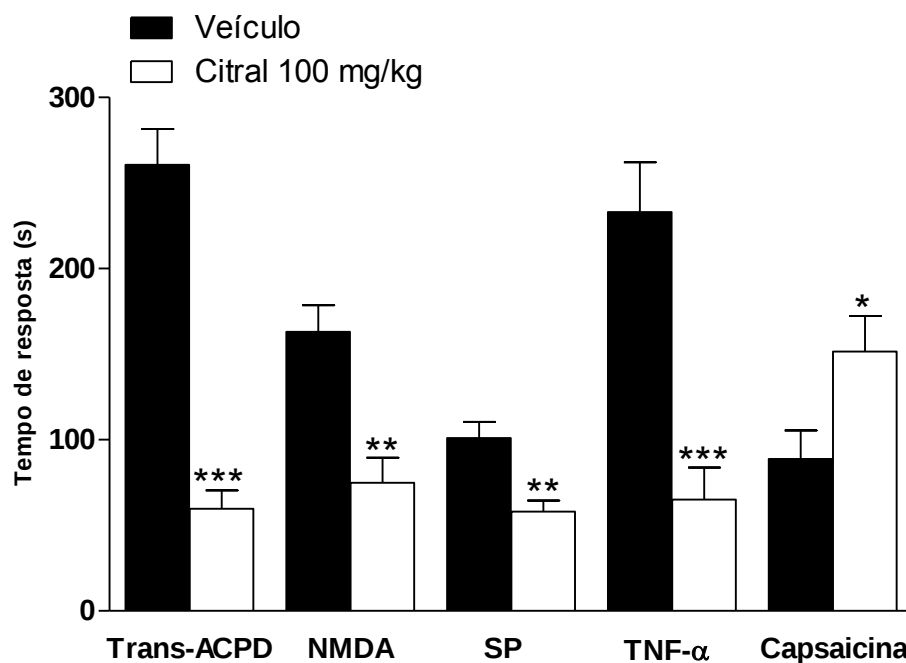


Gráfico 18: Efeito da administração oral de citral na dose de 100 mg/kg na indução de nocicepção induzida por injeção intratecal de TNF- α , substância P, capsaicina, agonista NMDA e trans ACPD em camundongos. ANOVA seguido de teste t. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Citral (100 mg/kg, p.o) é capaz de inibir significativamente o comportamento de *licking* induzido pela injeção intraplantar de cinamaldeído, mentol e forbol miristato (gráficos 20, 21 e 22). Porém, sem efeito na indução da nocicepção induzida pela capsaicina administrada pela via intraplantar (gráfico 19).

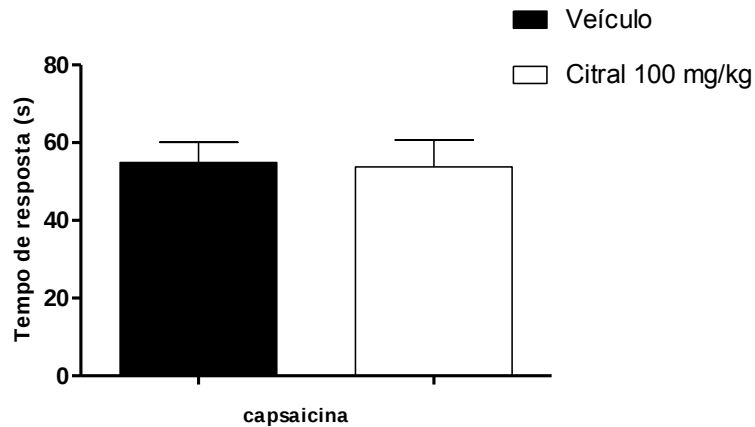


Gráfico 19: Efeito da administração oral do citral na dose de 100 mg/kg na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. ANOVA seguido de teste t. Tratamento em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

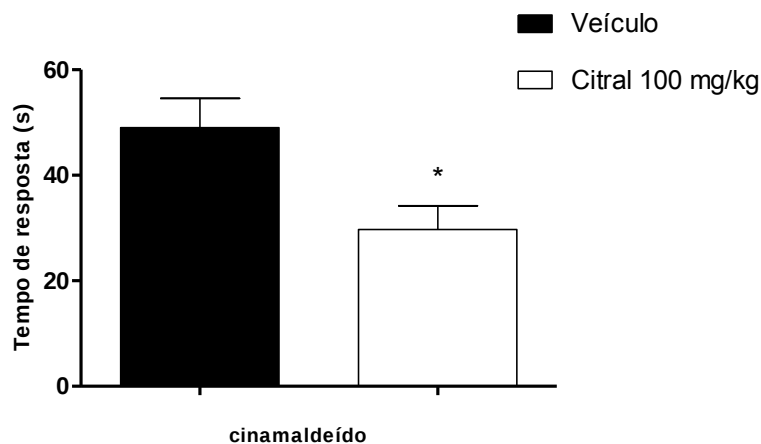


Gráfico 20: Efeito da administração oral do citral na dose de 100 mg/kg na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos. ANOVA seguido de teste t. * $p < 0,05$. Tratamento em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

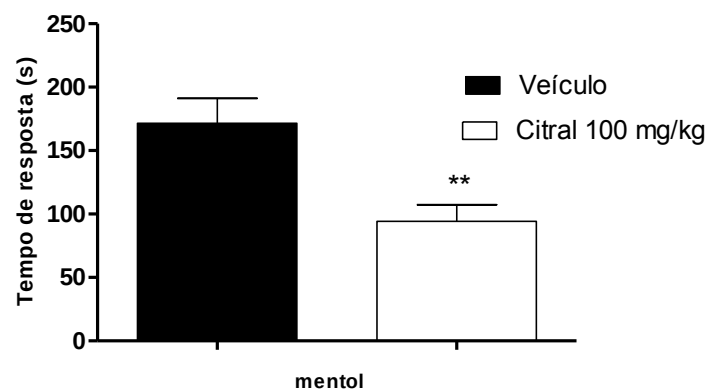


Gráfico 21: Efeito da administração oral do citral na dose de 100 mg/kg na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos. ANOVA seguido de teste t. ** $p < 0,01$. Tratamento em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

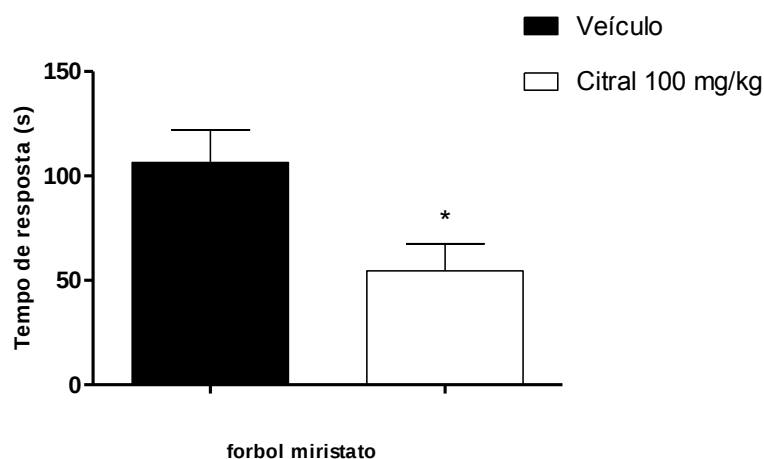


Gráfico 22: Efeito da administração oral do citral na dose de 100 mg/kg na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de forbol miristato em camundongos. ANOVA seguido de teste t. * $p < 0,05$. Tratamento em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Com a finalidade de avaliar o papel do sistema serotoninérgico no mecanismo de ação anti-nociceptivo do citral foi realizado pré-tratamento com os antagonistas serotoninérgicos ketanserina, ondansetron e WAY 100635 no teste da formalina. Apenas o pré-tratamento com ketanserina foi capaz de reverter o efeito do citral (gráfico 23).

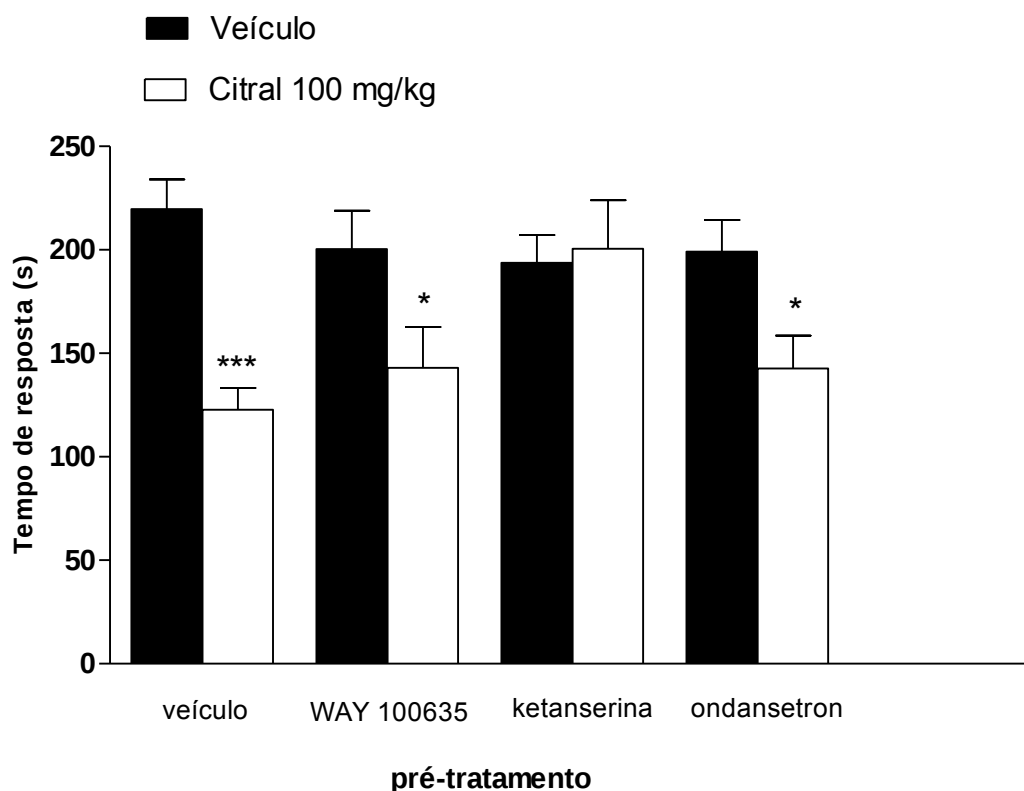
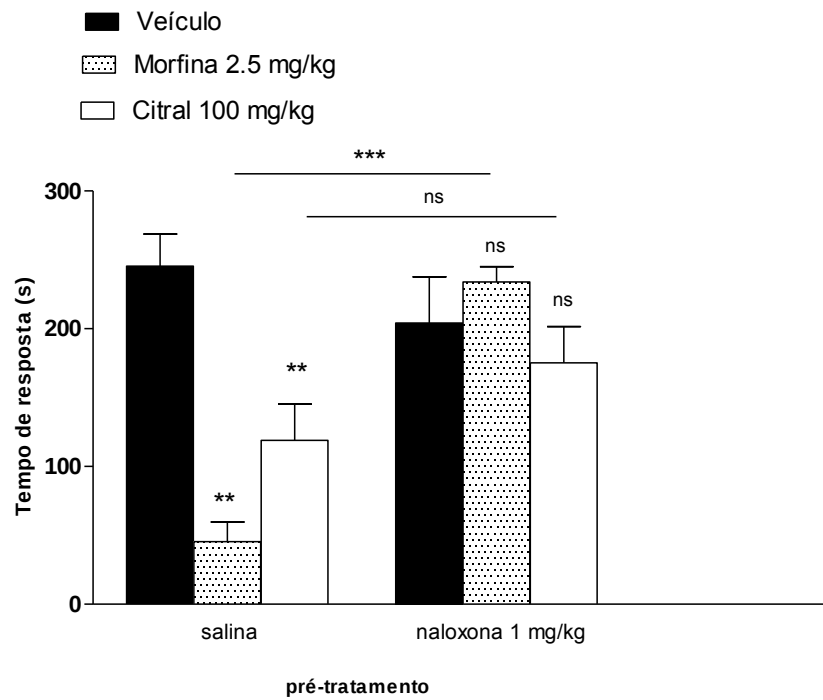


Gráfico 23: Avaliação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito anti-nociceptivo do citral administrado oralmente na dose de 100 mg/kg. ANOVA seguido pelo teste t. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Citral (100 mg/kg, p.o) não apresentou atividade anti-nociceptiva no modelo da formalina comparado ao grupo veículo frente ao pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p) (gráfico 24 A). No entanto, não houve diferença estatística significativa entre o grupo de animais tratados oralmente com o citral+pré-tratado com salina em relação ao grupo citral+pré-tratado com naloxona, sugerindo então uma reversão parcial do

efeito anti-nociceptivo do citral. Para concluirmos de forma mais consistente o envolvimento da via opióide, aumentou-se a dose de naloxona para 2 mg/kg, e foram acrescentados mais 3 grupos: tratados oralmente com o veículo ou citral (ambos pré-tratados com naloxona 2 mg/kg, i.p.) e um grupo de animais tratados oralmente com citral (pré-tratado com salina). O gráfico 24 B indica que, indubitavelmente, o efeito anti-nociceptivo do citral não é revertido frente ao pré-tratamento com o antagonista opióide.

A)



B)

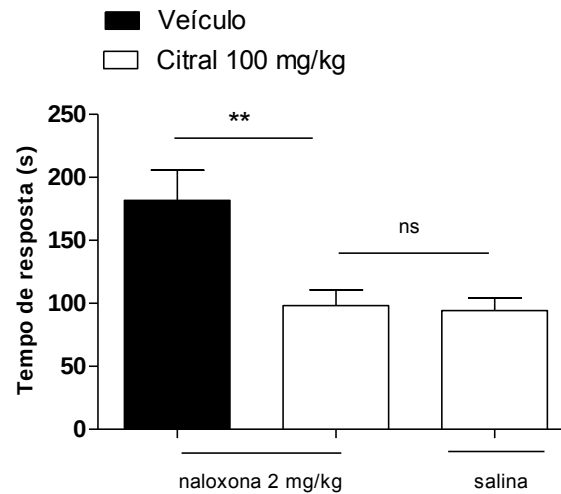


Gráfico 24: Avaliação do envolvimento do sistema opióide no efeito anti-nociceptivo do citral administrado oralmente na dose de 100 mg/kg. ANOVA seguido pelo teste Dunnett ** $p < 0,01$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

O óxido nítrico também não está envolvido com o mecanismo de ação de citral, como mostra o gráfico 25, em que o pré-tratamento com l-arginina (600 mg/kg, i.p), precursor da síntese de óxido nítrico, não reverteu o efeito anti-nociceção do citral.

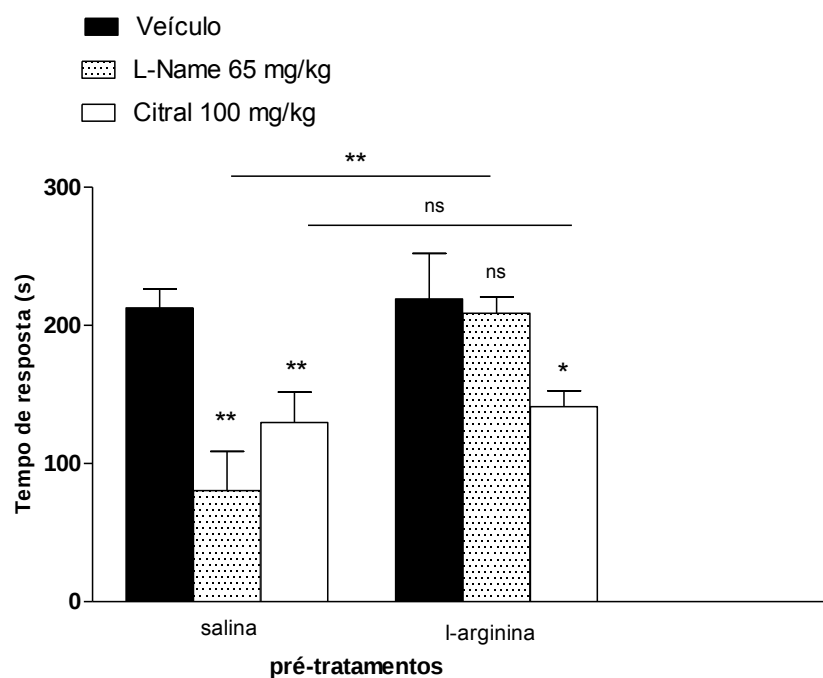


Gráfico 25: Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito anti-nociceptivo do citral administrado oralmente na dose de 100 mg/kg. ANOVA seguido pelo teste Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s.não-significante. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO:

Citral é um composto bioativo que pode ser obtido a partir de diversos óleos essenciais, entre eles capim-limão e erva cidreira (Carlini e cols., 1986; Carnat e cols., 1998). Essa substância é comumente empregada como realçador de sabor (principalmente na culinária do sudeste asiático), aromatizantes, perfumes, desinfetantes e repelentes (Opdyke, 1979).

Da mesma forma que outros compostos obtidos de vegetais tais como capsaicina, alicina, carvacrol, eugenol e vanilina, o citral ativa e modula canais iônicos TRPs (*transient receptor potencial*), atuando como agonista parcial de TRPV1, TRPV3, TRPM8 e TRPA1. Na culinária tailandesa, essa substância é frequentemente combinada com a capsaicina (pimenta) potencializando inicialmente a sensação de calor produzido pela pimenta e em seguida suprime esse efeito. Além disso, citral provoca sensação de frescor através da ativação de TRPM8, um receptor de estímulos térmicos frios (Tominaga e cols., 1998; Peier e cols., 2002; Jordt e cols., 2004; Calixto e cols., 2005; Xu e cols., 2005).

Proudfoot e cols. (2006) sugerem que ativação de TRPM8 culmina em efeito analgésico mediado por receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo II e III, diminuindo a sensibilização central no corno dorsal da medula e por consequência a reversão da alodínia em modelos de lesão do nervo ciático.

O efeito farmacológico do citral de maior relevância é a inibição que essa substância provoca em TRPV1, TRPV-3, TRPA1 e TRPM-8 após ativação desses receptores. Essa inibição ocorre somente em receptores inicialmente ativados, e é irreversível e cálcio-independente (Stotz e cols., 2008). Citral é menos potente que os clássicos agonistas TRPs; mentol, APB e isotiocianato. A ordem de potência de ativação do citral nesses receptores é TRPM8 > TRPV1 > TRPA1 > TRPV3 ao passo

que a potência de inibição da corrente evocada pela sua própria atividade agonista se dá na seguinte ordem $TRPV1 > TRPM8 > TRPA1 = TRPV3$.

Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é composto por isômeros trans (geranial) e cis (neral). Isomeria é uma característica importante que determina eficácia e efeito da droga, por exemplo, os isômeros da dihidropiridina apresentam efeitos antagônicos. O enantiômero levógeno ativa canal de cálcio voltagem dependente do tipo L enquanto que o enantiômero dextrógeno bloqueia (Franckowiaki e cols., 1985; Stotz e cols., 2008).

Citral apresenta tanto efeito de ativação como de inibição de TRPs, porém efeitos antagônicos não podem ser atribuídos aos seus isômeros. Da mesma forma que o citral, ambos os isômeros neral e geranial ativam fracamente TRPV1, TRPV3 e TRPM8 e em altas concentrações inibem o influxo iônico que eles induziram (Stotz e cols., 2008).

A interação do citral em TRPV1 não é idêntica à interação com a capsaicina, pois ativa TRPV1 mutantes que são insensíveis a capsaicina (mutação no resíduo 511 de tirosina para alanina). No entanto, citral também interage com regiões que contém resíduos de aminoácidos essenciais para a ativação de TRPV1 pela capsaicina. Sendo assim, sugere-se que citral apresenta regiões de modulação em comum com a capsaicina, porém, o sítio de ligação não é idêntico (Jordt e Julius, 2002; Stotz e cols., 2008). Registro eletrofisiológico realizado *in vitro*, realizado por Stotz e colaboradores, corrobora com a hipótese de um sítio diferente de ligação para o citral e para a capsaicina em TRPV1. Constatou-se que citral aumenta a corrente evocada pela capsaicina em receptores TRPV1, TRPV2 e TRPV3. Em contraste, citral não é capaz de aumentar e nem potencializar as correntes evocadas pelos agonistas mentol, APM e isotiocianato em TRPM8, TRPV4 e TRPA1, respectivamente, sugerindo assim, ausência de sítio de ligação específico para o citral em TRPM8, TRPV4 e TRPA1.

O processo de dessensibilização de receptores e sua fosforilação pelas proteínas quinases são mecanismos regulatórios importantes na transmissão no sinal nociceptivo. A sensibilização e a dessensibilização de TRPV1 são reguladas pelas proteínas quinase A e C (PKA e PKC). A fosforilação por PKC promove sensibilização de TRPV1, promove a abertura desses canais e aumenta o recrutamento de TRPV1 para a membrana celular por meio de exocitose de vesículas citosólicas. Já a fosforilação do canal TRPV1 por PKA potencializa sua resposta por redução da dessensibilização provocada pela estimulação contínua do agonista capsaicina (Mohapatra e Nau, 2003; Kauer e Gibson 2009).

Capsaicina promove dessensibilização em receptores TRPV1 através da fosfatase calmodulina-dependente denominada calcineurina (que leva a desfosforilação do receptor) (Koplas e cols., 1997; Numazaki e cols., 2003; Calixto e cols., 2005). *In vitro*, a dessensibilização de TRPV1 pelo citral ocorre mesmo em condições de alta concentração de BAPTA (quelante de Ca^{2+}) sugerindo que a dessensibilização de TRPV1 provocada pelo citral é cálcio-independente e deve estar relacionada com outra via citosólica (Stotz e cols., 2008).

Já se sabe que a capsaicina administrada topicamente pode ser útil para alguns tipos de dor (como os sintomas da Síndrome da Dor Complexa Regional, por depleção de substância P de neurônios peptidérgicos (Cheshire e Snyder, 1990) e a coadministração de capsaicina e anandamida (um canabinóide) produzem efeito sinérgico na intensidade da resposta de TRPV-1. Agonistas parciais TRPV-1 podem ser úteis como agentes anti-inflamatórios e analgésicos (Deal e cols., 1992; Epstein e Marcoe, 1994; Roberts e cols., 2002).

A sensação dolorosa ocorre em consequência a um estímulo lesivo, ou potencialmente nocivo, gerado nos tecidos somáticos ou viscerais. Diferente da dor

aguda, a dor inflamatória e neuropática são persistentes e caracterizam um estado crônico. Associado ao aumento da ocorrência de pacientes acometidos com artrite, diabetes, infecções virais, câncer, AIDS e as limitações dos fármacos utilizados na clínica para o tratamento da dor, gerou um crescente interesse no desenvolvimento e buscas de novas substâncias com potencial analgésico (Rosberg e cols., 2005).

A hiperalgesia ao frio, ao calor e aos estímulos mecânicos é característica presente na dor inflamatória e neuropática. Esses estímulos são transduzidos pelas fibras C e pelas fibras A. Um neurônio pode responder a vários estímulos integrando-os e gerando uma resposta que potencializa todos esses estímulos (nociceptores polimodais) (Levine e cols., 2007; Julius e Basbaum 2001).

O primeiro modelo experimental selecionado neste trabalho para avaliar o potencial anti-nociceptivo do citral, bem como sua relação dose-resposta, foi o teste da formalina. Nesse modelo bifásico de 30 minutos de observação, os 5 primeiros minutos após a administração do agente álgico representam a dor aguda resultante da estimulação imediata e direta dos nociceptores (fase neurogênica). Enquanto que os últimos 15 minutos de observação caracterizam a dor tardia, resultante do processo inflamatório periférico (Hunskar e Hole, 1987). Na fase inflamatória, a transdução ocorre através de receptores periféricos polimodais existentes ao redor dos pequenos vasos que sinalizam para o sistema nervoso central via fibra C aferente (Kumazawa e cols., 1996). A estimulação química da solução de formalina evoca predominantemente transmissão via fibra C, no entanto, na fase neurogênica, as fibras A δ são responsáveis pela rápida transmissão do estímulo nociceptivo (Tjølsen e cols., 1992; Julius e Basbaum, 2001).

Mc Namara (2007) demonstra que a injeção intraplantar de formalina estimula neurônios sensoriais por ativação direta em TRPA1 pelo formaldeído (constituente da

solução de formalina). Andrade e cols. (2008) sugerem que a nocicepção induzida por agonistas TRPA1 é significativamente reduzida por antagonistas histaminérgicos (H1) e de substância P (receptor NK1). Além disso, a ativação de TRPA1 nestes neurônios podem indiretamente estimular a degranulação de mastócitos via liberação de neurocininas.

Já é conhecida a ação inibitória do citral em canais TRPA1 (Stotz e cols., 2008). Viana e cols., (2000) sugerem que o efeito anti-nociceptivo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (que contém citral em sua composição) no modelo de nocicepção aguda induzida pela injeção intraplantar de formalina ocorra por inibição em TRPA1. Esses registros estão de acordo com o resultado obtido nesse trabalho, em que observamos a capacidade do citral em inibir o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de cinamaldeído, um agonista TRPA1 (gráfico 20).

Citral foi eficaz na inibição de ambas as fases do teste da formalina apenas na dose de 300 mg/kg (p.o). Nas doses de 100 mg/kg sua ação na fase inflamatória se mantém porém, sem efeito na fase neurogênica. Na dose de 25 mg/kg (p.o), o citral deixa de exercer efeito anti-nociceptivo (gráficos 1 e 2).

Com base na inibição da dor neurogênica do citral na dose de 300 mg/kg (p.o) avaliamos o citral no modelo de indução de edema de orelha pelo xilol.

Xilol é uma mistura de 3 formas isoméricas: para, meta e orto-xileno. Essa substância aromática é absorvida rapidamente pelas camadas da pele, causa irritação imediata e alcança rapidamente o lúmen vascular (Ahaghotu e cols., 2005; Morgan e cols., 1991). É utilizada em grande quantidade nos combustíveis, tinturas, solventes e preparação de lâminas histológicas. Xileno possui ação pró-inflamatória aguda de origem predominantemente neurogênica mediada pelos neurônios sensíveis a capsaicina. Há evidências do envolvimento da substância P e peptídeo relacionado ao

gene da calcitonina (CGRP) na ativação das fibras sensoriais pelo xilol. Substância P provoca extravasamento de plasma (e conseqüentemente edema) através da ativação de receptores NK1 (neurocininas) nas células do endotélio vascular, enquanto que CGRP potencializa o efeito da substância P através da indução de vasodilatação (Geppetti e cols., 1996). Sandor e cols., (2009) investigaram o papel dos receptores TRPV1 no edema induzido pelo xileno, através de deleções gênicas em camundongos e concluíram que o extravasamento de plasma provocado pela administração tópica de xilol é independente da ativação de TRPV1.

Nesse modelo de inflamação neurogênica, citral apresentou atividade apenas na dose de 300 mg/kg. De maneira similar, na fase neurogênica do teste da formalina e no modelo de nocicepção térmica a 56° C, citral apresentou atividade apenas na dose de 300 mg/kg, perdendo seu efeito quando a dose é diminuída para 100 mg/kg (gráficos 3 e 4). Apenas as fibras do tipo A δ I são sensíveis a temperaturas altas (acima de 52° C) e essas constituem apenas 10 % das fibras que participam da transmissão do estímulo nociceptivo. Sendo assim, uma substância anti-nociceptiva provavelmente exerce um efeito modulador maior em fibras C e A δ II do que em fibras A δ I (Petrovski e cols., 2006). De fato, Le Bars e cols., (1996 e 2001) constataram que a morfina inibe mais facilmente a resposta nociceptiva produzida pelas fibras C do que a resposta produzida pelas fibras A δ no corno dorsal da medula. Isso indica que citral possui um amplo espectro de ação, pois sua atividade anti-nociceptiva não está limitada apenas à fibras C e A δ II que transduzem somente temperaturas médias (em torno de 42° C).

Adicionalmente, citral também mostrou-se efetivo aumentando significativamente o tempo de latência de resposta frente ao estímulo térmico da placa quente à 48° C em animais submetidos à incisão intraplantar, conforme será discutido mais adiante.

Entre os ensaios experimentais de nocicepção térmica, a placa quente está entre os mais utilizados, e apresenta grande confiabilidade e reprodutibilidade (Cochin, 1968). Os animais são expostos ao calor e provoca o mínimo de injúria tecidual. A placa quente, em temperatura constante, produz dois tipos de respostas comportamentais em camundongos: pular ou lambe (ou balançar) a pata. Trata-se de um ensaio que integra respostas supra-espinhais, sendo assim, útil para avaliar efeito central de substâncias analgésicas (Chapman e cols., 1985).

Em todos os experimentos de placa quente, os animais foram selecionados no dia anterior. Durante a seleção, registramos os valores basais de cada animal para verificar que não existe diferença estatística significativa dos tempos basais entre grupos que receberão os respectivos tratamentos, garantindo assim homogeneidade dos animais e evitando resultado falso positivo ou falso negativo.

Com a finalidade de excluir a possibilidade de que o efeito anti-nociceptivo do citral observado nos testes comportamentais de formalina e placa quente resulte de ações inespecíficas, tais como efeito relaxante muscular ou efeito na diminuição da coordenação e atividade locomotora, foram realizados os testes de campo aberto (open field) e barra giratória (rota rod). Citral nas doses de 100 e 300 mg/kg não interfere na performance locomotora dos animais (gráfico 5 e 6).

Vale e cols., (2002) avaliaram o efeito do citral sobre o sistema nervoso central através dos modelos de indução do sono por pentobarbital, efeito sobre a ansiedade no modelo de labirinto em cruz elevado e performance locomotora nos modelos de campo aberto e barra giratória (rota road). Esses autores observaram efeito relaxante muscular, sedativo e ansiogênico do citral apenas em altas doses (200 mg/kg, via intraperitoneal). No entanto, em nosso trabalho, estamos utilizando o citral apenas na via de administração oral. Isso implica numa quantidade menor da substância atingindo a

circulação sanguínea em relação aos experimentos realizados com o citral pela via de administração intraperitoneal.

Dor crônica difere da dor aguda em termos de duração e mudanças adaptativas tais como neuroplasticidade (Besson, 1999). Com a finalidade de verificar o efeito do citral em modelos que caracterizam processos que ocorrem na clínica médica, começamos por avaliar o efeito do citral na dor aguda pós-operatória em modelo de incisão intraplantar em camundongos.

A dor aguda pós-operatória é caracterizada por dor espontânea, alodínia mecânica e térmica e hiperalgesia (Zahn e cols., 2002). No modelo animal de incisão intraplantar, a dor induzida resulta de lesões da pele, fáscia, músculos e pequenas inervações da pata. O aumento da sensibilidade mecânica envolve processos de hiperalgesia primária e secundária, sugerindo envolvimento tanto de sensibilização periférica como central. No período imediato a dor pós-operatória ocorre um quadro de dor espontânea no local da cirurgia em decorrência da hiperalgesia primária (causada pela sensibilização das fibras aferentes primárias), assim como dor em torno da incisão em decorrência da hiperalgesia secundária (desencadeada pela sensibilização central) (Pogatzki e cols., 2002). Além disso, Pogatzki e colaboradores mostraram que fibras A-delta e fibras C são sensibilizadas pela incisão e que a ativação de nociceptores silenciosos mecânicos tem papel na manutenção da hiperalgesia após a incisão.

Citral foi capaz de inibir a alodínia mecânica durante 5 dias após a incisão, com efeito máximo obtido na dose de 100 mg/kg, 2 horas após sua administração (gráficos 8 e 10).

Citral também mostrou-se efetivo em aumentar significativamente o tempo de latência para retirada da pata operada nos animais colocados em placa quente (48° C) submetidos à incisão intraplantar (gráfico 9). No entanto, quando partimos para o teste

de placa fria à 10° C não observamos diferença entre o grupo não-operado e o grupo veículo-operado (dados não mostrados), tornando assim o experimento inconclusivo quanto à ação do citral nesse modelo de hiperalgesia térmica ao frio.

Existem poucos estudos que investigaram as mudanças na responsividade ao calor no quadro de dor pós-operatória em pacientes. Sabe-se que ocorre diminuição do limiar de dor estímulo térmico quente aplicado adjacente a incisão em pacientes após colecistectomia e hernioplastia inguinal. No entanto, os mecanismos de hiperalgesia térmica na dor pós-operatória em humanos ainda são desconhecidos.

Citral foi avaliado no modelo de lesão pós isquemia-reperfusão (IR), em camundongos. A lesão por isquemia-reperfusão caracteriza a dor persistente em roedores por mecanismos similares ao que ocorre na Síndrome da Dor Complexa Regional-I em humanos. A alodínia mecânica nesse modelo experimental é consequência da ativação de fibras C musculares levando a sensibilização central, em que receptores NMDA medulares estão envolvidos na iniciação e manutenção da sensibilização central. O mesmo mecanismo não é observado em tecidos cutâneos, uma vez que a ativação de fibras C de tecidos superficiais não resulta em sensibilização central e alodínia mecânica, sugerindo então que essa condição ocorra apenas em lesões teciduais mais profundas (Wall e Wolf, 1984; Gao e cols., 2007).

No modelo animal de isquemia-reperfusão, a fase inicial (2° dia após a indução da lesão) é caracterizada pela resposta inflamatória aguda tais como aumento da permeabilidade vascular (edema), produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, injúria vascular e danos musculares decorrente do processo isquêmico (Coderre e cols., 2004). Nessa fase são efetivas drogas como morfina, dexametasona e pregabalina (Millecamps e Coderre, 2008). Já a fase crônica tardia (com início a partir do 7° dia após a indução da lesão), a dor é resultante tanto do processo inflamatório como da

degeneração dos nervos periféricos (edema endoneural decorrente do stress oxidativo e rompimento da barreira hemato-encefálica). Da mesma maneira que na fase inicial, pregabalina também apresenta efeito na fase tardia, porém morfina e dexametasona deixam de exercer efeito na alodínia mecânica na fase tardia. Sabe-se que a morfina é um analgésico mais potente na dor inflamatória do que na dor neuropática (Przewlocki e Przewlocka, 2011).

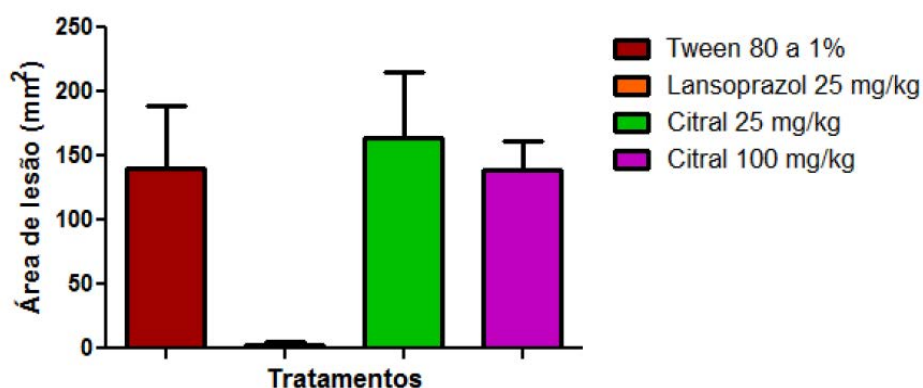
Millicamps e Coderre (2008) sugerem que as drogas anti-convulsivantes apresentam maior efeito do que os anti-inflamatórios na hiperalgesia induzida por isquemia-reperfusão.

Após a indução de lesão por isquemia-reperfusão, os animais apresentam 3 distintas condições para o estabelecimento da neuropatia: 1) inflamação aguda quando o tecido exibe danos oxidativos e produção de mediadores inflamatórios locais (fase inicial, 2º dia após a lesão) (Nagamatsu e cols., 1996; Nukada e cols., 2000); 2) persistente condição isquêmica, o qual diretamente causa danos aos vasos sanguíneos (Fitzal e cols., 2002) ; 3) lesão neuropática secundária devido a degeneração das fibras nervosas como consequência da pobre irrigação sanguínea (Nagamatsu e cols., 1996). A fase tardia da dor crônica pós-isquêmica é resultante da combinação dessas 3 condições.

Citral inibiu a alodínia mecânica apenas na fase tardia na dose de 100 mg/kg, alcançando efeito máximo uma hora após o tratamento (gráfico 12). Entretanto, não apresentou atividade na fase inicial do modelo (gráfico 11), sugerindo que o mecanismo anti-nociceptivo do citral esteja relacionado aos eventos que contribuem para o estabelecimento da fase tardia da lesão e não por atuação em processos inflamatórios agudos e danos oxidativos predominante na fase inicial da lesão por isquemia e reperfusão.

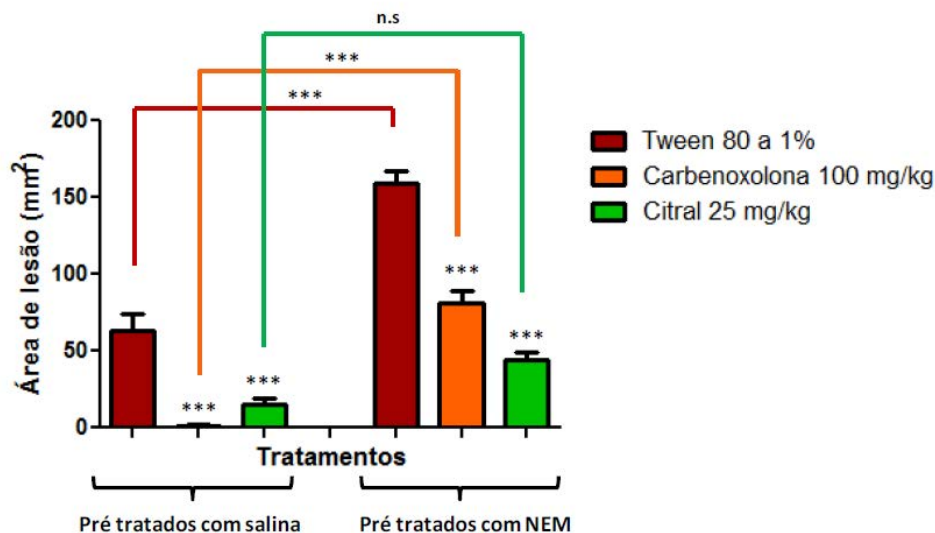
Os resultados da avaliação da atividade gastroprotetora do citral obtidos em nosso laboratório corrobora com tal hipótese. Citral não apresentou atividade gastroprotetora no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão (Ganev, 2011, comunicação pessoal). Adicionalmente, o efeito gastroprotetor do citral no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol não foi revertido pelo tratamento com NEM (um bloqueador de grupamentos sulfidrílicos, elemento chave na defesa anti-oxidante) (gráficos 26 e 27).

Gráfico 26: Avaliação do citral no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia e reperfusão em ratos (Ganev, 2011, comunicação pessoal)



ANOVA seguida de teste Dunnett. Tratamentos comparados ao grupo veículo (tween 80 a 1%). Diferenças estatísticas não foram constatadas em quaisquer tratamentos (resultados obtidos da área de úlcera (mm²)).

Gráfico 27: Avaliação do envolvimento de grupamento sulfidrílicos na gastroproteção do Citral 25 mg/kg no modelo de indução de úlcera por etanol em ratos (Ganev, 2011 comunicação pessoal).



ANOVA seguida de teste Dunnett e Tukey, em que os grupos experimentais foram comparados ao grupo tratado com o veículo. Ns indica diferença estatística não significativa e *** $p < 0,001$.

Embora todos os resultados acima discutidos convirjam para a conclusão de que citral não apresenta efeito anti-oxidante e que por esse razão não apresentou efeito na fase inicial do modelo da SDCR-I, se fazem necessárias dosagens bioquímicas dos constituintes enzimáticos e não enzimáticos para afirmar seguramente a ausência de efeito anti-oxidante.

Coderre e cols. (2004) obtiveram redução da alodínia mecânica 48 horas após a indução da lesão no modelo de isquemia-reperfusão através de pós- tratamento com substâncias seqüestradoras de radicais livres (tempol e n-acetilcisteína) em ratos. Sabe-se que uma substância capaz de manter em homeostasia os níveis de espécies radicalares, ou seja, atuar como antioxidante impedindo o quadro de estresse oxidativo, ela também pode apresentar efeito anti-inflamatório (Grabmann et. al. 2000).

Outra hipótese que sustenta a ausência de atividade na fase inicial da SDCR-I seria o fraco efeito anti-inflamatório do citral. Não obtivemos efeito anti-edematogênico no edema de pata induzido pela carragenina em nosso laboratório (dados não mostrados), resultado que está de acordo com o artigo de Ortiz e cols., (2010) em que

os autores constataam atividade edematogênica no edema de pata induzido pela carragenina em ratos apenas em elevadas doses de citral (1g/kg).

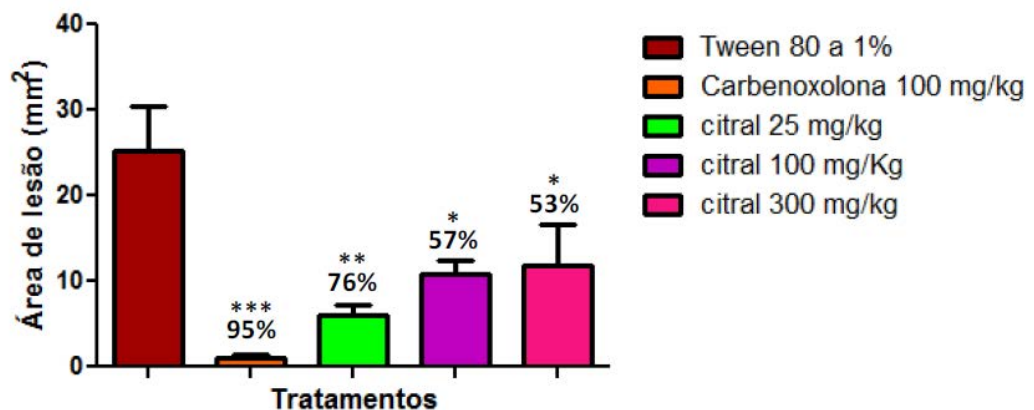
Adicionalmente a esses dados, diferente do efeito anti-inflamatório da dexametasona, citral não foi capaz de inibir o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico em camundongos, nas duas doses testadas (gráfico 5). Ácido araquidônico, quando aplicado topicamente, produz imediato aumento na permeabilidade vascular, resultando em edema associado ao marcante aumento dos níveis de prostaglandinas (PGE2 e PGF2 α), tromboxano A2 e leucotrienos LTB4 e LTC4 (Nonato e cols., 2011).

Óxido nítrico (NO) é um importante mediador inflamatório envolvido na vasodilatação, exsudação e migração de leucócitos durante o processo inflamatório (Abramson, 2008). Possui também importante papel na transmissão e processamento da informação nociceptiva (Jin e cols., 2010; LaBuda e cols., 2006). NO pode ser liberado após estimulação direta das fibras aferentes primárias, promovendo a sensibilização de nociceptores e aumentando a excitabilidade das fibras nervosas (Aley *et al.*, 1998). No entanto, esse mediador não está envolvido no mecanismo de ação do citral. Como mostra o gráfico 25, o tratamento com l-arginina (600 mg/kg, i.p) não foi capaz de reverter o efeito anti-nociceptivo do citral.

Outro resultado que nos leva a inferir sobre a fraca atividade anti-inflamatória do citral, foi a ausência da capacidade dessa substância em potencializar a úlcera gástrica induzida pelo anti-inflamatório indometacina, em vez disso, citral promoveu gastroproteção. No entanto, é marcante a relação inversa de dose-efeito, em que a menor dose de citral apresenta melhor atividade gastroprotetora (76%), ao passo que na dose de 300 mg/kg, a porcentagem de gastroproteção cai para 53% (gráfico 28). É possível que, aumentando-se a dose de citral, tenha ocorrido potencialização do efeito da

indometacina entretanto não o suficiente para gerar o agravamento da lesão gástrica. De fato, Ortiz e cols. (2010) demonstraram por análise isobolográfica que o efeito anti-inflamatório *in vivo* obtido pela administração conjunta de citral com o anti-inflamatório naproxeno ocorre de forma sinérgica.

Gráfico 28: Efeito gastroprotetor do citral nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg no modelo de indução de úlcera por indometacina em ratos (Ganev, 2011 comunicação pessoal).



ANOVA seguida de teste Dunnett. Todos os grupos experimentais foram comparado ao grupo tratado com veículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Dessa maneira, constatamos que citral apresenta tanto efeito analgésico, como efeito gastroprotetor, o que torna essa substância bastante interessante do ponto de vista terapêutico, tendo em vista os riscos e complicações gastrointestinais com o uso prolongado de fármacos utilizados na dor crônica.

O modelo de neuropatia induzida pela constrição do nervo ciático mimetiza os sintomas observados em humanos que apresentam algum tipo de lesão nervosa mecânica, dessa forma, esse modelo é amplamente utilizado em animais para avaliação do potencial analgésico de procedimentos fisioterápicos ou substâncias químicas (Seltzer e cols., 1990; Campbell e Meyer, 2006).

Na dor neuropática, através do modelo de constrição parcial do nervo ciático, citral (100 mg/kg, p.o) mostrou efeito durante 3 horas após o tratamento (gráfico 13). A

dose de 300 mg/kg apresentou efeito apenas 1 hora após o tratamento, porém na dose de 25 mg/kg citral não exerceu efeito. O efeito máximo foi obtido duas horas após o tratamento no grupo que recebeu citral 100 mg/kg (p.o).

O desenvolvimento da dor neuropática após a lesão nervosa periférica envolve não somente vias neuronais mas também células de Schwann, células satélites no gânglio da raiz dorsal, componentes do sistema imune, recrutamento e ativação de astrócito e micróglia na medula (Streit, 2002; Hanani, 2005).

A lesão periférica nervosa provoca uma resposta neuroimune: macrófagos e células de Schwann contribuem para a degeneração waleriana, devido a liberação de metaloproteinases, substância P, bradicinina, óxido nítrico, prostaglandinas, IL-1, IL-18, TNF- α , LIF (fator inibitório de leucemia) e consequentemente hiperemia, edema e recrutamento de monócitos e linfócitos T (Mueller, 2001; Perrin e cols., 2005; Shubayev, 2006; Tofaris e cols., 2002; Scholz e Woolf, 2007).

Em seguida, ocorre desmielinização e proliferação da célula de Schwann por ativação de um receptor heteromérico ERBB2 pela neuregulina, um fator de crescimento expresso constitutivamente pela membrana axonal. As células de Schwann, por sua vez, liberam prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias, NGF (fator de crescimento neuronal). NGF ativa indiretamente TRPV1 via proteína quinase e aumenta a expressão de receptor purinérgico e canal de sódio, promovendo assim aumento da excitabilidade nervosa (Carroll e cols., 1997; Esper e Loeb, 2004; Malin, 2006; Lindholm e cols. 1987, Cortright e Szallasi 2004).

Os potenciais de ação disparados provenientes da lesão periférica produzem plasticidade neuronal, ou seja, mudanças fenotípicas adaptativas medulares que resultam em aumento da sensibilidade no corno dorsal por consequência do aumento da fosforilação de canais iônicos por proteínas quinases, aumento da transcrição de

receptores e seu tráfego para a membrana, aumento da neurotransmissão excitatória, diminuição da neurotransmissão inibitória e ativação microglial (Campbell e Meyer 2006).

A ligação de ATP em receptores purinérgicos P2RX4 desencadeia a ativação microglial após a lesão nervosa, liberando BDNF, o qual induz na subpopulação de neurônios da lâmina I do corno dorsal, uma inversão da corrente inibitória gabaérgica. Em adição, citocinas liberadas pela micróglia, tais como TNF- α e IL-1 β ativam diretamente os neurônios aferentes primários e os neurônios do corno dorsal. No gânglio da raiz dorsal, a ligação de ATP em receptores purinérgicos P2RX7 e P2RX7 expressos em macrófagos regula a liberação das citocinas por esse tipo celular (Tsuda, 2003; Zhang e cols., 2007, Chen e cols., 2005).

A duração da resposta imune no sistema nervoso central é mais persistente do que a reação inflamatória no local do nervo lesado, o qual termina com a remoção dos restos de mielina durante a degeneração walleriana (Scholz e Woolf, 2007).

Neste cenário, as novas abordagens para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da dor neuropática incluem substâncias que possam modular a atividade de canais iônicos, inibir o metabolismo glial, antagonizar receptores purinérgicos ou atuar na atividade das proteínas quinases, e por consequência na fosforilação/desfosforilação de canais iônicos (Campbell e Meyer 2006; Chong e Bajwa, 2003).

O tempo para obtenção de efeito máximo do citral foi variável entre os modelos. O efeito máximo de ação do citral foi obtido 120 minutos após o tratamento oral nos modelos de DPO e CPNC, 90 minutos após a administração no modelo da placa quente e 60 minutos após a administração no modelo da SDCR-I. Citral na dose de 100 mg/kg (p.o) correspondeu a dose que apresentou efeito máximo na alodínia mecânica nos

modelos de DPO, SDCR-I e CPNC. Assim, elegemos essa dose para caracterizar as vias e mecanismos de ação envolvidos na nocicepção dessa substância.

A fosforilação de receptores pelas proteínas quinases são mecanismos regulatórios importantes na transmissão do sinal nociceptivo. As quinases regulam múltiplas propriedades de canais iônicos dependentes de ligante (Rochel e cols., 1994) tais como magnitude de corrente, dessensibilização, recrutamento e tráfego para a membrana (Swope e cols., 1999; Urushihara e cols., 1992; Barry and Ziff, 2002), como por exemplo, a localização celular de receptores NMDA através da fosforilação da subunidade NR1 pela PKC (Sánchez – Pérez e Felipo, 2005).

Um substancial número de estudos moleculares tem demonstrando que PKC tem papel chave no processo de transmissão da dor. Diterpeno forbol miristato acetato (PMA) é um conhecido ativador de PKC e produz sensibilização de nociceptores. Os níveis de PKC estão aumentados em neurônios do corno dorsal após estímulos nocivos ou lesão nervosa periférica. Inibidores de proteínas quinases ou deleção do gene codificador de PKC diminuem significativamente a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos. Taniguchi e cols., (1997) constataram que a injeção intraplantar de PMA induz comportamento de *licking*, *flinching* com duração por mais de 45 minutos em ratos. O estabelecimento da resposta nociceptiva provocada pelo PMA está associada a contínua ativação de receptores NK1 espinais.

Edema, eritema e reação inflamatória celular no local da injeção de PMA foram observados em estudos histológicos e sugere-se que substância P exerce um papel crucial na transmissão do impulso nociceptivo evocado da periferia para a medula espinal. Por conseguinte, Tsuchiya e cols., 2005 obtiveram inibição da resposta nociceptiva induzida pelo PMA através da administração de ezlopitant, um antagonista

NK1 com capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. Conforme mostra no gráfico 22, citral 100 mg kg (p.o) inibiu de significativamente a nocicepção induzida pela ativação de proteína quinase C. Esse dado indica que o provável mecanismo de ação do citral esteja relacionado com a via da PKC ou com a transmissão do estímulo nociceptivo modulado pela substância P.

Injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos e citocinas promove imediato comportamento de dor (*biting*, *licking* e *scratching*) em camundongos. Adicionalmente, os neurônios ativados pelo glutamato liberam mediadores inflamatórios e neuropeptídeos que também estão envolvidos na transmissão nociceptiva tanto no sistema nervoso central como na periferia (Tadano e cols., 1999; Zahn e cols., 2002).

Citral foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, mentol, intratecal de trans-ACPD (agonista não seletivo de receptor metabotrópico glutamatérgico), NMDA (agonista de receptor ionotrópico glutamatérgico), substância P e TNF- α (gráfico 17, 18 e 21).

Em contrapartida, citral potencializou significativamente a nocicepção induzida pela capsaicina (i.t.) (gráfico 18), resultado este que corrobora com os ensaios eletrofisiológicos de Stotz e cols. (2008) que constataram que citral potencializa as correntes evocadas pela capsacína em TRPV1 (despolarização). Obtivemos um resultado diferente quando a capsaicina é injetada pela via intraplantar. Conforme mostra o gráfico 19, o tempo de resposta entre o grupo tratado e não-tratado é igual.

Essa diferença observada entre o efeito do citral quando a capsaicina é injetada pela via intratecal e pela via intraplantar provavelmente se deve a diferentes quantidades de receptores TRPV1 expressos na medula e na periferia. No entanto, estudos adicionais são necessários para sustentar tal hipótese.

TRPM8 é ativado por temperaturas moderadas (25° C- 28° C) e pode ser ativado e sensibilizado por agentes químicos como mentol. Em humanos, a aplicação de mentol resulta em hiperalgesia ao frio, possivelmente por sensibilizar esse receptor nas fibras C (Namer e cols., 2008). Assim, a aplicação de mentol pode ser um modelo para alodínia ao frio evocado por sensibilização periférica. Citral 100 mg/kg, foi capaz de inibir significativamente a resposta nociceptiva evocada pelo mentol aplicado intraplantarmente. Esse resultado, juntamente com o estudo eletrofisiológico de Stotz e cols., 2008 indica fortemente que TRPM8 possui papel na anti-nocicepção induzida pelo citral.

O efeito do citral na diminuição do edema de orelha induzido pelo xilol (que provoca extravasamento de plasma via liberação de substância P) corrobora com a inibição do citral no modelo de *bitting* induzido pela injeção intratecal de substância P.

Substância P está ligada com a facilitação do estímulo nociceptivo na hiperalgesia pós-incisão. Durante o processo inflamatório, substância P induz a liberação de citocinas, derivados do ácido araquidônico, histamina, estimulando o recrutamento de leucócitos e potencializando o dano tecidual e a resposta inflamatória (Bhatia, 2010). Camundongos com deleção no gene codificador da substância P ou tratados com antagonista NK-1 apresentam redução na alodínia mecânica e térmica em modelo de dor aguda pós-operatória (Sahbaie e cols., 2009).

O sistema glutamatérgico e as citocinas inflamatórias tais como TNF- α participam no estabelecimento e manutenção da dor crônica e são cruciais na transmissão do sinal nociceptivo e na sensibilização central (Meller e Gebhart 1993).

As 3 principais classes de receptores excitatórios glutamatérgicos são: 1- NMDA, receptor ionotrópico seletivamente responsivo a N-metil-D-aspartato, envolvidos na transmissão de estímulos químicos, térmicos e mecânicos. 2- não-

NMDA: receptor ionotrópico seletivamente sensível ao ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e cainato, com papel importante na transmissão de estímulos inócuos e nocivos. 3- receptores metabotrópicos que produzem tanto excitação como inibição das células do trato espinotalâmico e apresentam um papel crucial na manutenção da dor crônica (Yaksh, 1999; Mori e Mishina, 1995, Nakanishi, 1992).

Evidenciamos neste trabalho a ação do citral em receptores glutamatérgicos periféricos, em que obtivemos a inibição em 50 % da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (gráfico 16). Já tem sido investigado o envolvimento dos receptores periféricos glutamatérgicos NMDA na SDCR-1. O bloqueio desses receptores, através da administração tópica de ketamina, reduziu a alodínia em pacientes com a SDCR-I (Finch e cols., 2009).

Em vista do efeito do citral na nocicepção induzida por TNF- α , agonistas de receptores glutamatérgicos e substância P, podemos concluir que juntas, todas essas vias/substâncias, estão envolvidas na diminuição da transmissão da nocicepção moduladas pelo citral, tanto em nível periférico como central, o que culmina com o potencial dessa substância em inibir a alodínia mecânica nos modelos de DPO, SDCR-I e CPNC.

Kleinschnitz e cols.(2004) demonstraram que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β em modelos de lesão periférica. TNF- α , uma das principais citocinas derivadas das células da glia na medula espinal, possui um papel importante na alodínia mecânica induzida por agentes quimioterápicos (Kiguchi e cols., 2008).

Por sua vez, TNF- α aumenta a expressão de receptores glutamatérgicos e diminui a expressão de receptores GABAa via TNFR1, produzindo uma descarga

espontânea em fibras A δ and C, fenômeno conhecido como “*wind-up*” (Sorkin e cols., 1997, Stellwagen e cols., 2005, Reeve e cols., 2000). Wind-up é definido como aumento da responsividade do corno dorsal por repetidas descargas de baixa frequência nas fibras C, dependente da ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (Mendell, 1966; Dickeson e Sullivan, 1987). Esse processo também está relacionado com o desenvolvimento da alodínia mecânica (Ma e Woolf, 1995; Minani e cols., 2001). Bennett e cols. (2000) sugerem que tanto os receptores NMDA, como AMPA estão envolvidos na alodínia mecânica, porém sem papel na alodínia térmica na neuropatia induzida por hemiseção espinal.

Já foi bem elucidado que a via serotoninérgica atua tanto na via descendente inibitória quanto na via excitatória (facilitadora) da dor e ambas se originam dos núcleos da rafe, que é a maior fonte neuronal de síntese de serotonina nos mamíferos. (Fields e cols., 1991; Millan, 2002). O sistema serotoninérgico descendente inibitório faz parte de uma via que suprime impulsos que chegam na medula espinal, por modulação da atividade da projeção neuronal diretamente ou através de interneurônios medulares (Alhaider e cols., 1991) diminuindo assim a transmissão da dor (Millan, 1995). No entanto, os múltiplos tipos de receptores 5-HT na medula espinal, pré e pós sinápticos, parecem ter contrastantes funções no controle da nocicepção (Millan, 1995; Bardin e cols., 2000).

O gráfico 23 mostra que o receptor serotoninérgico do tipo 5HT-2A está envolvido com o mecanismo anti-nociceptivo do citral, porém way e ondansetron, antagonistas 5 HT-_{3A} e 5 HT-_{1A}, respectivamente, não foram capazes de reverter o efeito do citral, indicando que esses receptores não apresentam envolvimento significativo no mecanismo de ação dessa substância.

Além do sistema serotoninérgico, o sistema opióide é um mecanismo endógeno do organismo para conter a dor. Na periferia, tais efeitos são produzidos pela interação entre peptídeos opióides derivados dos leucócitos e os receptores opióides existentes na terminação dos neurônios aferentes primários, graças às citocinas anti-inflamatórias e/ou endocanabinóides (Rittner e cols., 2008; Stein e cols., 2003). Estes receptores são transportados do gânglio da raiz dorsal para os terminais periféricos nervosos (Mousa e cols., 2001) e esse transporte é estimulado por citocinas e por fator de crescimento de nervos produzidos no tecido inflamado (Mousa e cols., 2007), o que resulta num aumento da densidade de receptores opióides nos terminais nervosos nesses tecidos (Stein e cols., 1990). Esses eventos conduzem aos efeitos anti-nociceptivo e anti-inflamatório dos opióides endógenos (Stein e cols., 2009). Os nossos resultados indicam o envolvimento do sistema opióide não participa diretamente no mecanismo de modulação nociceptiva pelo citral, uma vez que o efeito do citral não foi revertido pelo pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg, i.p), um antagonista opióide (gráfico 24). Diferente do efeito da morfina, ambas as doses não alteraram a motilidade intestinal de camundongos, mais uma vez indicando a improvável interação do citral com o sistema opióide como potencial mecanismo de ação (gráfico 29).

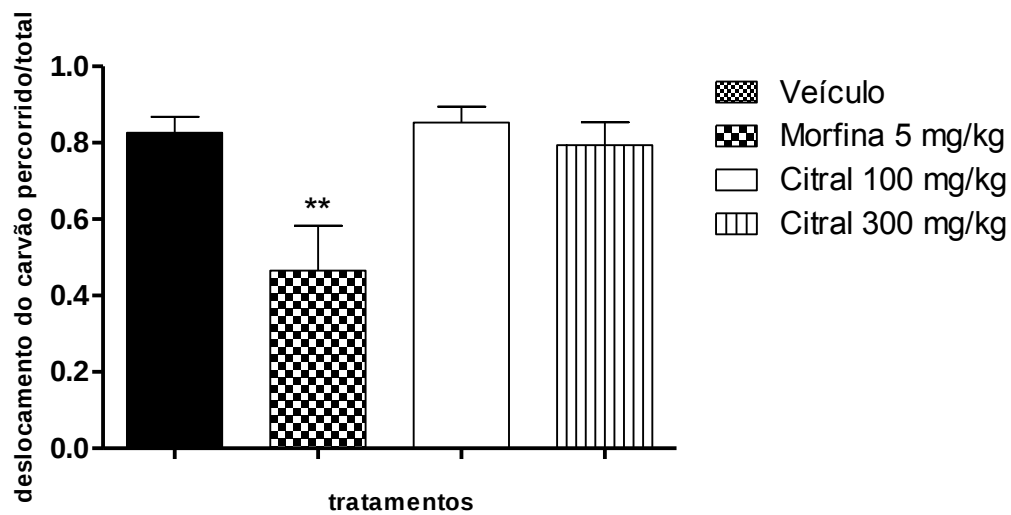
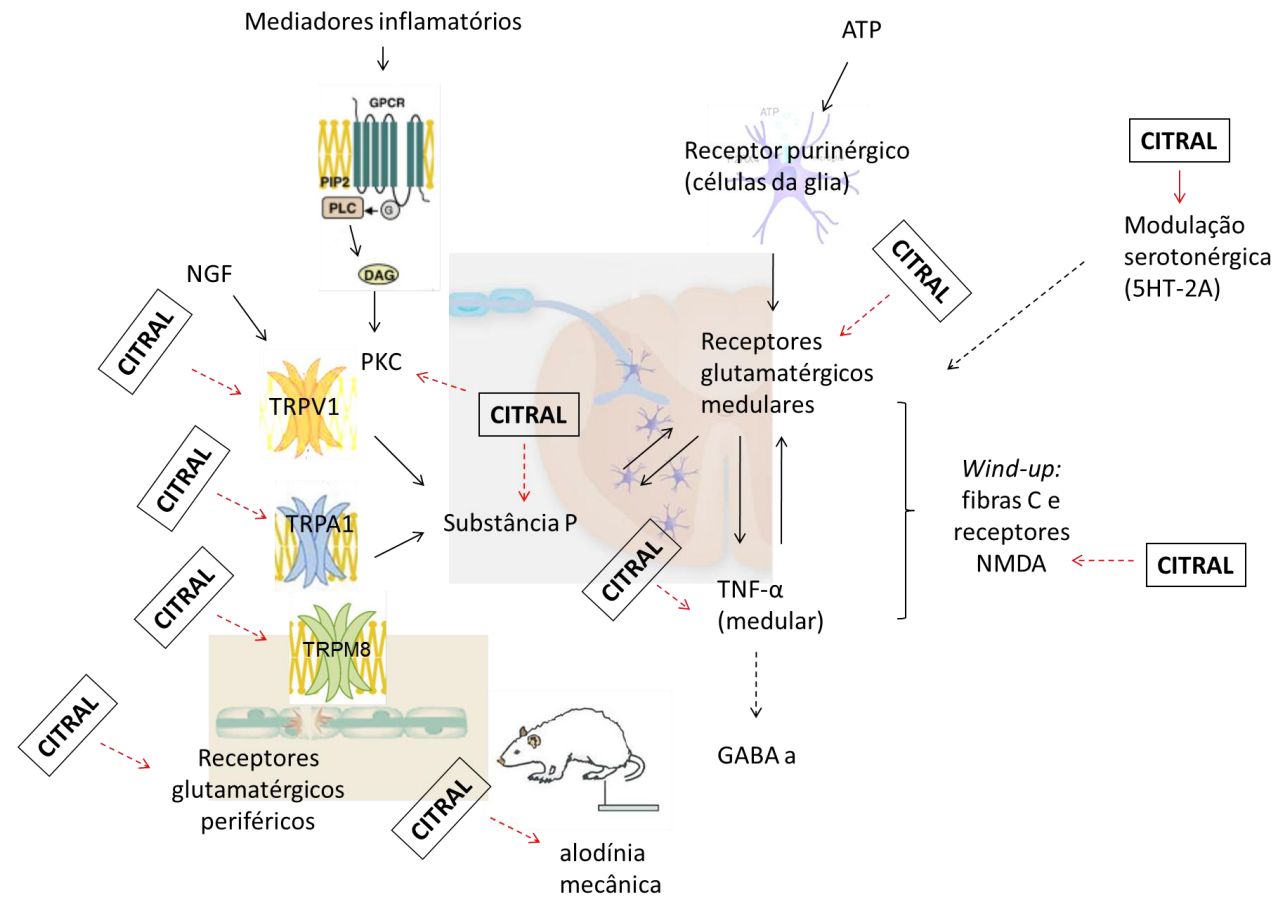


Gráfico 29: Efeito do citral na motilidade intestinal. ANOVA seguido pelo teste Dunnett. ** $p < 0,01$. Tratamentos em relação ao grupo controle (veículo). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 6: Mecanismo de ação do citral



as setas tracejadas indicam inibição e as setas contínuas estimulação/liberação/ativação, de maneira indireta ou direta.

Figura 7: Resposta celular inflamatória, neuronal e glial após lesão periférica nervosa (dor neuropática)

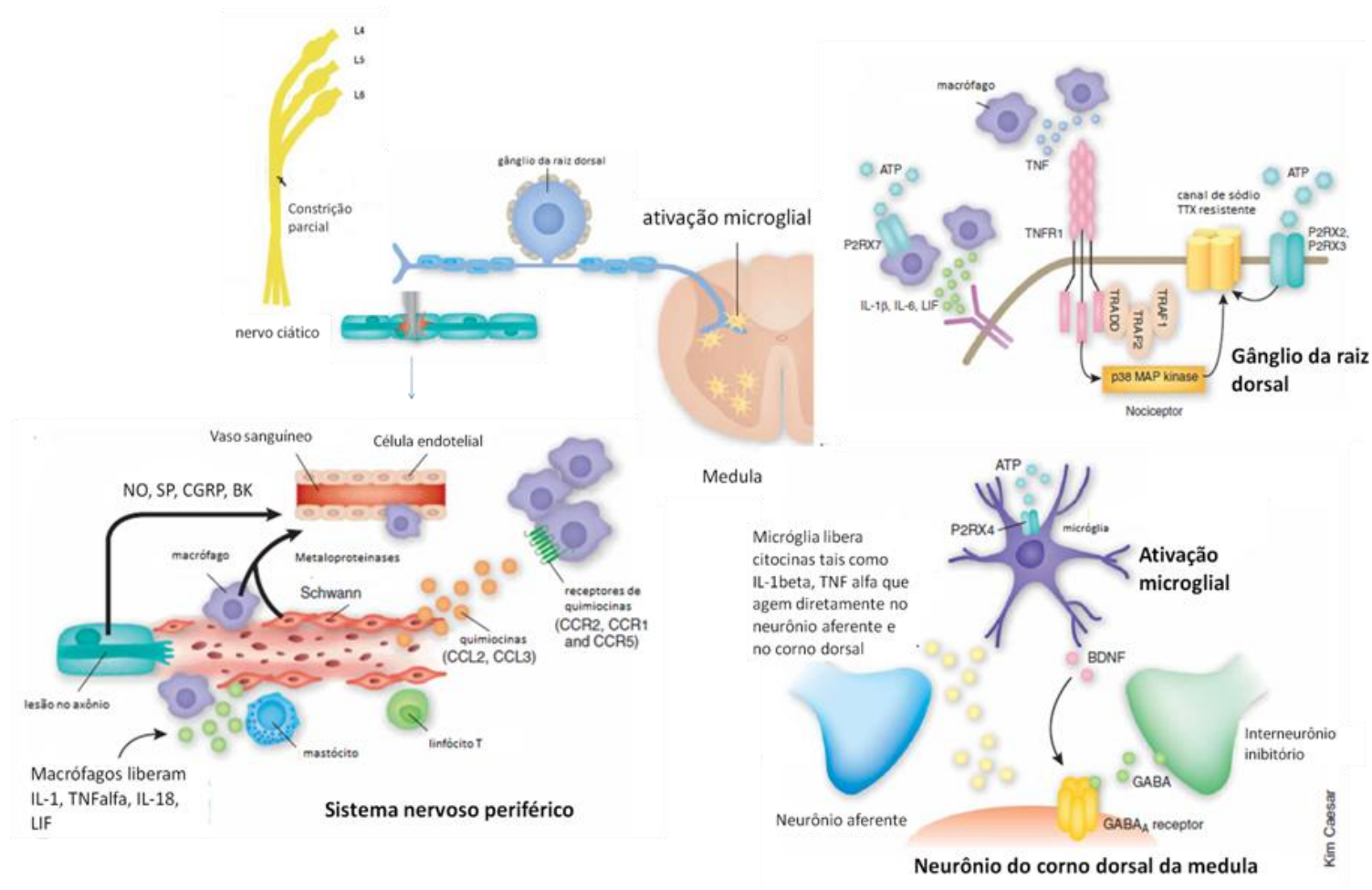
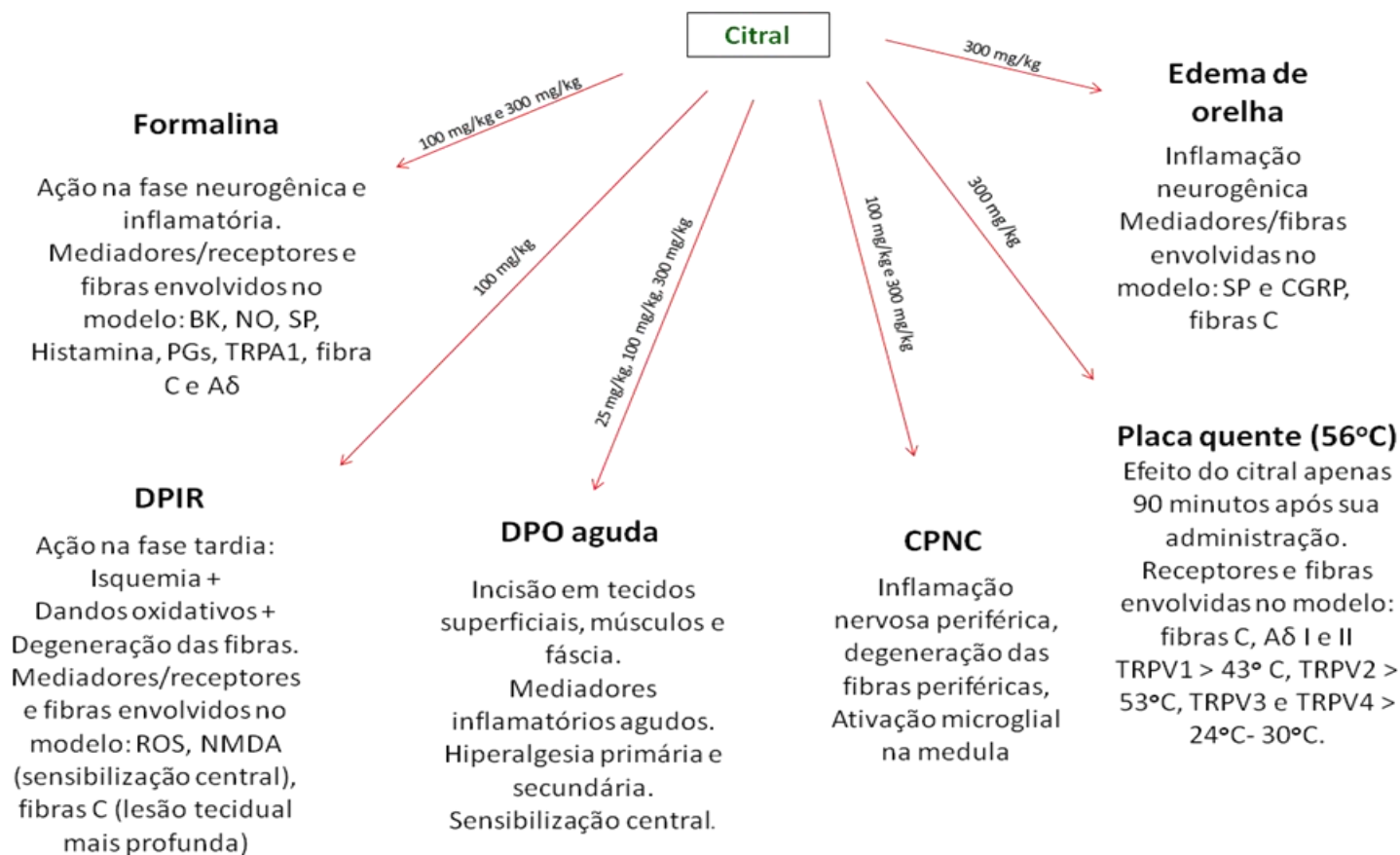


Figura 8: Atividade anti-nociceptiva do citral em modelos agudos e crônicos



4. CONCLUSÃO:

Podemos concluir que citral administrado via oral, apresenta potencial para tratamento da dor neuropática, tais como a dor na Síndrome da Dor Complexa regional e na dor aguda pós-operatória, condições que tem representando um desafio na terapêutica clínica. Verificamos que seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da transmissão nociceptiva via PKC, TNF- α , substância P, receptores glutamatérgicos (NMDA e metabotrópicos), 5HT- 2_A , TRPA1 e TRPM8.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abrahams, M.J. Neuropathic pain in soft tissue complaints. **Best Practice e Research Clinical Rheumatology** 21 (2), 223- 244, 2007.

Ahaghotu, E., Babu, R.J., Chatterjee, A., Singh, M. Effect of methyl substitution of benzene on the percutaneous absorption and skin irritation in hairless rats. **Toxicol. Lett.** 159, 261–271, 2005.

Albrecht, P.J., Hines, S., Eisenberg, E.. Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. **Pain** 120, 244–66, 2006.

Allen, G., Galer, B.S., Schwartz, L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. **Pain** 80, 539–44, 1999.

Andrade, E.L., Luiz, A.P., Ferreira, J., Calixto, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience** 152, 511-520, 2008.

Atay, S., Tarnawski, A.S., Dubois, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other Lipids Mediators** 61, 105-124, 2000.

Baggio, C.H., Freitas, C.S., Martins, D.F., Mazzardo, L., Smiderle, F.R., Sassaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C.A., Santos, A.R.S. Antinociceptive Effects of (1-3),(1-6)-Linked β -Glucan Isolated From *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. **The Journal of Pain** 11 (10), 965-971, 2010.

Barry, M.F., Ziff, E.B., 2002. Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. **Curr. Opin. Neurobiol.** 12, 279–286.

Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Pobleto, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell** 124, 1269-1282, 2006.

Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.** 924, 219-228, 2002.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet** 353: 1610-1615, 1999.

Bennett, G.J., Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain** 33 (1), 87-107, 1988.

Bennett, A.D., Everhart, A.W., Hulsebosch, C.E. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. **Brain Research** 859, 72-82, 2000.

Brennan, T.J., Vandermeulen, E.P., Gebhart, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain** 64, 493-501, 1996.

Brennan, T. Pathophysiology of postoperative pain. **Pain** 152, 33-40, 2011.

Brito, A.R.M.S. e Antonio, M.A. Oral anti-inflammatory and ulcerogenic activities of a hydrialcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 61, 215-228, 1998.

Broadhurst, P.L. Determinants of emotionality in the rat: Situational Factor. **Br. J. Psychol.** 48, 1-12, 1957.

Bruehl, S., Carlson, C.R. Predisposing psychological factors in the development of reflex sympathetic dystrophy. A review of the empirical evidence. **Clin. J. Pain** 8, 287-299, 1992.

Bruehl, S., Chung, O.Y. Psychological and behavioral aspects of complex regional pain syndrome management. **Clin J Pain** 22, 430–437, 2006.

Campbell, J.N. e Meyer, R.A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**. 52 (1), 77-92, 2006.

Calixto, J.B., Candida A.L., Kassuya, E, André E., Ferreira, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology and therapeutics** 106, 179-208, 2005.

Carlini, E.A., Contar, J.D.P., Silva-Filho, A.R., Silveira-Filho, N.G. Frochtengartten, M.L., Bueno, O.F.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal Ethnopharmacology** 17, 37-64, 1986.

Carnat, A.P., Carnat. A., Fraisse, D. Lamaison, J.L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae** 72 (5), 301-305, 1998.

Carroll, S.L., Miller, M.L., Frohnert, P.W., Kim, S.S., Corbett, J.A. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. **J. Neurosci.** 17, 1642–1659, 1997.

Castaño, A., Bell, M., Perry, H. Unusual aspects of inflammation in the nervous system: Wallerian Degeneration. **Neurobiology of Aging** 17 (5), 745-751, 1996.

Chapman, C.R., Casey, K.L., Dubner, R., Foley, K.M., Graceley, R.H., Reading, A.,E. Pain measurement: an overview. **Pain** 22, 1– 31, 1985.

Chen, Y., Li, G.W., Wang, C., Gu, Y., Huang, L.Y. Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. **Pain** 119, 38–48, 2005.

Cheshire, W.P., Snyder, C.R., 1990. Treatment of reflex sympathetic dystrophy with topical capsaicin. Case report. **Pain** 42, 307–311, 1990.

Chong, M. S. e Bajwa, Z.H. Diagnosis and treatment of neurophatic pain. **Journal of Pain and Symptom Management** 25, 4-11, 2003.

Cochin, J. Methods of the appraisal of analgetic drugs for addiction liability. In: Burger A, editor. **Selected Pharmacological Testing Methods**. New York: Marcel Dekker, 121–167, 1968.

Coderre,T.J., Dimitris N., Xanthos, L.F., Bennett, G.J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain** 112, 94–105, 2004.

Coderre, T.J., Bennett, G.J. A Hypothesis for the Cause of Complex Regional Pain Syndrome-Type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. **Pain Medicine** 11, 1224–1238, 2010.

Córdova, M.M, Werner, M.F.P., Silva, M.D., Ruani, A.P., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience letters** 495 (3), 173-177, 2011.

Cortright, D.N., Szallasi, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. **An update Eur J Biochem.** 271, 1814–1819, 2004.

Cousin, M.J., Power, I., Smith, G. Pain: a persistent problem. **Reg. Anesth. Pain Med.** 25, 6–21, 2000.

Deal, C.L., Schnitzer, T.J., Lipstein, E., Seibold, J.R., Stevens, R.M. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. **Clin. Ther.** 13, 83–395, 1991.

deCharms, R.C., Maeda, F., Glover, G.H., Ludlow, D., Pauly, J.M., Soneji, D., Gabrieli, J.D., Mackey, S.C. Control over brain activation and pain learned by using real-time functional MRI. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 102, 18626–18631, 2005.

de Mos, M., de Bruijn, A.G., Huygen, F.J. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain** 1, 12–20, 2006.

Dickenson, A.H., Sullivan, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequent dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology** 26, 1235-1238, 1987.

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J. Anaesth.** 75, 125-131, 1995.

Duman, I., Dincer, U., Taskaynatan, M.A. Reflex sympathetic dystrophy: a retrospective epidemiological study of 168 patients. **Clin. Rheumatol.** 26 (9), 1433-1437, 2007.

Dunham, N.W. Myia, T.S. A note an simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** 46, 208-209, 1957.

Dyck, P.J., Dyck, P.J., Larson, T.S., O'Brien, P.C., Velosa, J.A. Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group. **Diabetes Care** 23, 510–517, 2000.

Eddy, N.B., Leimback, D.B. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 107, 385–393, 1953.

Elias, W.J., Burchiel, K.J. Microvascular decompression. **Clin. J. Pain** 18, 35–41, 2002.

Esper, R.M. e Loeb, J.A. Rapid axoglial signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. **J. Neurosci.** 24, 6218–6227, 2004.

Epstein, J.B., Marcoe, J.H. Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 77, 135–140, 1994.

Feliu, M.H., Edwards, C.L. Psychologic factors in the development of Complex Regional Pain Syndrome: History, Myth, and Evidence. **The Clinical Journal of Pain** 26, 258–263, 2010.

Finch, P.M., Knudsen, L., Drummond, P.D. Reduction of allodynia in patients with complex regional pain syndrome: A double-blind placebo-controlled trial of topical ketamine. **Pain** 146, 18–25, 2009.

Fitzal, F., DeLano, F.A., Young, C., Schmid-Schonbein, G.W. Early capillary no-reflow during low-flow reperfusion after hind limb ischemia in the rat. **Ann. Plast. Surg.** 49, 170–180, 2002.

Ferreira, J., Trichês, K.M., Medeiros, R., Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Pain** 117, 171–181, 2005.

Franckowiak, G., Bechem, M., Schramm, M., Thomas, G. The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on Ca channels. **Eur. J Pharmacol.** 114, 223–226, 1985.

Gao, X., Kim, H.K., Chung, J.M., Chung, K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain** 131, 262–271, 2007.

Gadotti, V.M., Tibola, D., Pazcuk, A.F. Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B. Santos, A.R.S. Contribution of spinal glutamatergic receptor to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Research** 1093, 116–122, 2006.

Gayraud, M. Raynauds's phenomenon. **Joint Bone Spine** 74, 1–8, 2007.

Gedney, J.J., Glover, T.L., Fillingim, R.B. Sensory and affective pain discrimination after inhalation of essential oils. **Psychosom. Med.** 66, 599–606, 2004.

Geppetti, P., Holzer, P. Neurogenic Inflammation. **CRC Press, Boca Raton**, 1996.

Gilron, I., Bailey, J.M., Tu, D. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. **New England Journal of Medicine** 352(13), 1324-1334, 2005.

Graßmann, J., Hippeli, S., Dornisch, K., Rohnert, U., Beuscher, N., Elstner, E.F. Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. **Arzneimittel-Forsch** 50, 135-139, 2000.

Hanani, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res. Rev.** 48, 457–476, 2005.

Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Review** 60, 214-225, 2009.

Heinricher, M.M., Ingram, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. In: Bushnell, M.C., Basbaum, A.I. (Eds.), **The Senses, a Comprehensive Reference**. Pain 5. Academic Press, San Diego, 593–626, 2008.

Henriques, M.G., Silva P.M., Martins, M.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Assrey-Filho J., Cordeiro, R.S. Mouse paw edema. A new model for inflammation ? **Braz. J. Med. Biol. Res.** 243-249, 1987.

Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature** 435, 1108–1112, 2005.

Hunskar, S., Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30(1), 103-104, 1987.

Hylden, J.L., Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice a new technique. **Eur. J. Pharmacology** 67, 313-316, 1980.

Iyadomi, M., Higaki, Y., Ichiba, M., Morimoto, M., Tomokuni, K. Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. **Ind. Health.** 36, 40–51, 1998.

Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature** 427, 260–265, 2004.

Jordt, S.E., Julius, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. **Cell** 108, 421–430, 2002.

Julius, D., Basbaum, A.I. Mechanisms molecular of nociception. **Nature** 413, 203–210, 2001.

Just, M.J., Recio, M.C., Giner, R.M., Cuellar, M.J., Manez, S., Bilia, A.R., Rios, J.L. Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticosens*. **Planta Medica** 64, 404-407, 1998.

Kauer, J.A., Gibson, H.E. Hot flash: TRPV channels in the brain. **Trends in neurosciences** 32 (4), 215-223, 2009.

Kehlet, H., Jensen, T.S., Woolf, C.J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet** 367, 1618–1825, 2006.

Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Kishioka S. Up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in spinal cord contributes to vincristine-induced mechanical allodynia in mice. **Neuroscience Letters** 445, 140–143, 2008.

Kim, M.J., Nam E.S., Paik, S.I. The effects of aromatherapy on pain, depression, and life satisfaction of arthritis patients **Taehan Kanho Hakhoe Chi** 35, 186–194, 2005.

Kleinschnitz, C., Brinkhoff, J., Zelenka, M., Sommer, C., Stoll, G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. **J. Neuroimmunol.** 149, 77-83, 2004.

Kohr, D., Tschernatsch, M., Schmitz, K. Autoantibodies in complex regional pain syndrome bind to a differentiation-dependent neuronal surface autoantigen. **Pain** 143(3), 246–51, 2009.

Koplas, P.A., Rosenberg, R.L., Oxford, G.S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin response in rat dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Neuroscience** 17 (10), 3525-3537, 1997.

Kumazawa, T., Mizumura, K., Koda, H., Fukusako, H. EP receptor subtypes implicated in the PGE₂-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. **J. Neurophysiol.** 75, 2361– 2368, 1996.

Laine, L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and Coxibs. Perspectives in Pain Management: The role of coxibs. **Journal of Pain and Symptom Management** 25, 32-40, 2003.

Lalko, J., Api, A.M. Citral: identifying a threshold for induction of dermal sensitization. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 52, 62-73, 2008.

Leith, J.L., Wilson, A.W., Donaldson, L.F., Lumb, B.M. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception. **J. Neurosci.** 27, 11296–11305, 2007.

Levy, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences** 8, 601-606, 1969.

Levine, J.D., Alessandri-Harber, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta** 1772, 989-1003, 2007.

Lin, C.T., Chen, C.J., Lin, T.Y., Tung, J.C., Wang, S.Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresource Technology** 99, 8783-8787, 2008.

Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., Thoenen, H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature** 330, 658–659, 1987.

Loeser, J.D., Melzack Pain: an overview. **Lancet**. 353, 1607-1609, 1999.

Ma, Q.P., Woolf, C.J. Noxious stimuli induce an *N*-methyl-D aspartate receptor-dependent hypersensitivity of the flexion withdrawal reflex to touch: implications for the treatment of mechanical allodynia. **Pain** 61, 383–390, 1995.

Malin, S.A. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. **J. Neurosci.** 26, 8588–8599, 2006.

Marzocco, S., Di Paola, R., Serraino, I., Sorrentino, R., Meli, R., Mattaceraso, G., Cuzzocrea, S., Pinto, A., Autore, G. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. **Eur. J. Pharmacol.** 484, 341–350, 2004.

McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, Julius, D., Moran, M.M. Fanger, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 13525-13530, 2007.

Meller, S.T., Gebhart, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord, **Pain** 52, 127–136, 1993.

Mendell, L.M. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. **Exp. Neurol.** 16, 316–322, 1966.

Meotti, F.C., Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A.L., Calixto, J.B., Santos, A.R.S. Analysis of the antinociceptive effect of flavonoid myricitrin: evidence for a role

the l-arginine nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 789-796, 2006.

Millecamps, M., Coderre, T. J. Rats with chronic post-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome — type I. **European Journal of Pharmacology** 583, 97–102, 2008.

Minami, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Shimamoto K., Sakimurad, K., Mishinae, M., Moria, H., Itob, S. Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. **Brain Research** 895, 178-185, 2001.

Mohapatra, D.P., Nau, C. Desensitization of Capsaicin-activated Currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 is Decreased by the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Pathway. **The Journal of Biological Chemistry** 278 (50) 50080-50090, 2003.

Moussaoui, S.M., Montier, F., Carruette, A., Blanchard, J.C., Laduron, P.M., Garret, C. A non-peptide NK1-receptor antagonist, RP 67580, inhibits neurogenic inflammation postsynaptically. **Br. J. Pharmacol.** 109, 259–264, 1993.

Morgan, D.L., Cooper, S.W., Carlock, D.L., Sykora, J.J., Sutton, B., Mattie, D.R., McDougal, J.N. Dermal absorption of neat and volatile organic chemicals in the Fischer 344 rat. **Environ. Res.** 55, 51–63, 1991.

Mori, M., Mishina, M. Structure and function of the NMDA receptor channel, **Neuropharmacology** 34, 1219–1237, 1995.

Mueller, M. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. **Am. J. Pathol.** 159, 2187–2197, 2001.

Nacife, V.P., Soeiro, M., Gomes, R.N., D'Avila, H., Castro-Faria, H.C., Meirelles, N. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. **Cell Struct. Funct.** 29, 27–34, 2004.

Nagamatsu, M., Schmelzer, J.D., Zollman, P.J., Smithson, I.L., Nickander, K.K.,

Low, P.A. Ischemic reperfusion causes lipid peroxidation and fiber degeneration. **Muscle Nerve**. 19, 37–47, 1996.

Namer, B., Kleffetveit, I.P., Handwerker, H., Schmelz, M., Jorum, E. Role of TRPM8 and TRPA1 for cold allodynia in patients with cold injury. **Pain** 139, 63-78, 2008.

Neugebauer, V., Galhardo., V., Maione, S., Mackey, S.C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Research** 60, 226-242, 2009.

Nonato, F.R., Nogueira, T.M.O., Barros, T.A.A., Lucchese, A.M., Nonato, F.R., Nogueira, T.M.O., Barros, T.A.A., Lucchese, A.M., Oliveira, C.E.C., Santos, R.R.S., Soares, M.B.P., Villarreal, C.F. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 inhibition. **Journal of Ethnopharmacology** 136,518- 524, 2011.

Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H. Tominaga, M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. **PNAS** 100 (13), 8002-8006, 2003.

Nukada, H., McMorran, P.D., Shimizu, J., 2000. Acute inflammatory demyelination in reperfusion nerve injury. **Ann. Neurol.** 47, 71–79.

Opdyke, D.L. Monographs on fragrance rawmaterials. **Food Cosmet. Toxicol.** 17, 241–75, 1979.

Ortiz, M.I., Gonzalez-Garcia, M.P., Ponce-Monter, H.A, Castañeda-Hernández, G., Aguilar-Robles, P. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. **Phytomedicine** 18 (1), 74-79, 2010.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell** 108, 705–715, 2002.

Perrin, F.E., Lacroix, S., Aviles-Trigueros, M. & David, S. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin-1 β in Wallerian degeneration. **Brain** 128, 854–866, 2005.

Petrovski, E.F., Rosa, K.A., Facundo, V.A., Rios, K., Marques, M.C.A., Santos, A.R.S. Anti-nociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β -6 β -16 β -trihydroxylup(20)(29) ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 83, 90-99, 2006.

Pitcher, G.M., Henry, J.L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**. 186 (2), 173-197, 2004.

Pogatzki, E.M., Niemeier, J.S., Brennan, T.J. Persistent secondary hyperalgesia after gastrocnemius incision in the rat. **Eur. J. Pain** 6, 295–305, 2002.

Pogatzki, E.M., Gebhart, G.F., Brennan, T.J. Characterization of A and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. **J. Neurophysiol.** 82, 721-731, 2002.

Pogatzki, E.M., Raja, S.N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology** 99, 1023-1027, 2003.

Price, D.D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science** 288, 1769–1772, 2000.

Proudfoot, J., Garry, E.M., Cottell, D.F., Rosie, L., Andevoras, H., Robertson, D.C., Fleetwood-walker, S.M., Mitchell, R. Analgesia mediated by TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. **Current Biology** 16, 1591-1605, 2006.

Przewlocki, R., Przewlocka, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 429, 79–91, 2001.

Quintão, N.L., Balz, D., Santos, A. R. S., Campos, M. M., Calixto, J. B. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. **Neuropharmacology** 50(5), 614-20, 2006.

Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. **Eur. J. Pain** 4, 247–257, 2000.

Roberts, L.A., Christie, M.J., Connor, M. Anandamide is a partial agonist at native vanilloid receptors in acutely isolated mouse trigeminal sensory neurons. **Br. J. Pharmacol.** 137, 421–428, 2002.

Rosberg, H.E. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstruction Surgery and Hand Surgery** 39 (6), 360-369, 2005.

Rhudy, J.L., Williams, A.E., McCabe, K.M., Russell, J.L., Maynard, L.J. Emotional control of nociceptive reactions (ECON): do affective valence and arousal play a role? **Pain** 136, 250–261, 2008.

Sahbaie, P., Shi, X., Guo, T.Z., Qiao, Y., Yeomans, D.C., Kingery, W.S., Clark, J.D. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. **Pain** 145, 341–349, 2009.

Sakurada T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tanno, K., Sakurada, S., Kisara. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem.** 29, 271– 278, 1996.

Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists the spinal cord. **Neuropharmacology** (31) 12, 1279-1285, 1992.

Sánchez-Perez, A.M., Felipe, V. Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. **Neurochemistry internacional** 47, 84-91, 2005.

Sandor, K., Helyes, Z., Elekes, K., Szolcsányi, J. Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the transient receptor potential vanilloid 1 receptor xylene-induced nocifensive behavior and inflammation in the mouse. **Neuroscience letters** 451, 204-207, 2009.

Santos, A.R.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 289, 417–426, 1999.

Santos, A.R.S., Gadotti, V.M., Oliveira, G.L., Tibola, D., Paszcuk, A.F., Neto, A., Spindola, H.M., Souza, M.M., Rodrigues, A.L.S., Calixto, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology** 48,1021– 1034, 2005.

Saxena, S., Caroni, P. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. **Progress in Neurobiology** 83, 174-191, 2007.

Scholz, J. e Woolf, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature neuroscience** 10 (11), 1361-1368, 2007.

Scchuh, S., Large, R. Economic considerations in pain management. **Pharmacoeconomics** 3, 260-267, 1993.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain** 43,205–218,1990.

Serpell, M.G, Makin, A., Harvey, A. Acute pain physiology and pharmacology targets. **Acute pain** 1(3), 31- 47, 1998.

Siebel, J.S., Beirith, A., Calixto, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyron in mice. **Brain Res** 1003, 61–67, 2004.

Singh, G., Rosen Ramey, D: NSAID induced gastrointestinal complications: the ARAMIS perspective. **J. Rheumatol.** 51, 8-16, 1998.

Shipton, E.A. Complex regional pain syndrome – Mechanisms, diagnosis, and management. **Current Anaesthesia & Critical Care** 20, 209–214, 2009.

Shubayev, V.I. TNF α -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. **Mol. Cell. Neurosci.** 31, 407–415, 2006.

Sorkin, L.S., Xiao, W.H., Wagner, R., Myers, R.R. Tumour necrosis factor- α induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience** 81, 255–262, 1997.

Stanton- Hicks, M., Baron, R., Boas, R., Gordh T., Harden, N., Hendler, N., Koltzenburg, M., Raj, R., Wilder, R. Complex Regional Pain Syndromes: Guidelines for Therapy. **The Clinical Journal of Pain** 14(2), 155-166, 1998.

Steinmeyer, J. Pharmacology basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Res.** 2, 379-385, 2000.

Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., Malenka, R.C. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **J. Neurosci.** 25, 3219–3228, 2005.

Stotz, S.C., Vriens, J., Martyn, D., Clardy, J., Clapham, D.E. Citral Sensing by transient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. **Plos One** 3(5),1-14, 2008.

Streit, W.J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. **Glia** 40, 133–139, 2002.

Sunderland, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain** 74 (4), 491-516, 1951.

Swingle, K.F., Reiter, M.J., Schwatzmiller, D.H. Comparison of croton oil and antharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie** 254, 168-176, 1981.

Swope, S.L., Moss, S.J., Raymond, L.A., Huganir, R.L. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.** 33, 49–78, 1999.

Tadano, T., Namioka, M., Nakagawasai, O., Tan-No K, Matsushima, K., Endo, Y., Kisara, K. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Science** 65, 255-261, 1999.

Tanaka, K., Zhang, Q.L., Webster, H.D. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and effects of macrophage suppression and conditioning lesions. **Experimental Neurology** 118 (1), 53-61, 1992.

Taniguchi, K., Shinjo, K., Mizutani, M., Shimada, K., Ishikawa, T., Menniti, F.S., Nagahisa, A. Antinociceptive activity of CP- 101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br. J. Pharmacol.** 122, 809– 812, 1997.

Tsuda, M. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature** 424, 778–783, 2003.

Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., Campbell, J.N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Prog Neurobiol.** 38, 397–421, 1992.

Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51, 5–17, 1992.

Tsuchiya, M., Sakibara, A., Yamamoto, M. A tachykinin NK1 receptor antagonist attenuates the 4h-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. **European Journal of Pharmacology** 507, 29– 34, 2005.

Tofaris, G.K., Patterson, P.H., Jessen, K.R., Mirsky, R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **J. Neurosci.** 22, 6696–6703, 2002.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron** 21, 531–543, 1998.

Uçeyler N. e Sommer, C. Wallerian degeneration and neuropathic pain. **Drug Discovery Today Disease Mechanisms** 3 (3), 351-356, 2006.

Urushihara, H., Tohda, M., Nomura, Y. Selective potentiation of N-methyl-D-aspartate-induced current by protein kinase C in *Xenopus* oocytes injected with rat brain RNA. **J. Biol. Chem.** 267, 11697– 11700, 1992.

Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos, J.G., Vianna, G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Phytomedicine** 9, 709-714, 2002.

Veldhuyzen van Zanten, S.J. Commentary: bleeding ulcers, interaction between NSAIDs and *Helicobacter pylori* infection, and nonulcer dyspepsia. **Gastroenterology** 113, 90-92, 1997.

Verdú, E., Navarro, X. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**. 146 (1), 187-198, 1997.

Viana, G.S.B., Vale, T.G., Pinho, R.S.N., Matos, F.J.A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal Ethnopharmacology** 70, 323-327, 2000.

Wall, P.D., Woolf, C.J. Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. **J. Physiol.** (London), 356, 443–58 1984.

Warfield, C.A., Kahn, C.H. Acute pain management: programs in U.S. hospitals and experiences and attitudes among U.S adults. **Anesthesiology**. 83, 1090–1094, 1995.

Weissmann, G. Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation. **J. Lipid Mediat.** 6, 275–286, 1993.

Xu, H., Blair, N.T., Clapham, D.E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **J. Neurosci.** 25, 8924–8937, 2005.

Yaksh, T.L. Central pharmacology of nociceptive transmission, in: P.D. Wall, R. Melzack (Eds.), Textbook of Pain, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, 253–308, 1999.

Yang, Z., Xi, J., Li, J., Qu, W. Biphasic effect of citral, a flavoring and scenting agent, on spatial learning and memory in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 93, 391–396, 2009.

Young, J.M., Wagner, B.M., Spires, D.A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. **The Journal of investigative dermatology** 80, 48-52, 1983.

Zahn, P.K., Slukab, K.A., Brennan, T.J.. Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. **Pain** 100, 65–76, 2002.

Zahn, P.K., Pogatzki, E.M., M.D. Brennan, T.J. Mechanisms for Pain Caused by Incisions. **Regional Anesthesia and Pain Medicine** 27 (5), 514–516, 2002.

Zhang, X., Chen, Y., Wang, C., Huang, L.Y. Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 104, 9864–9869, 2007.

Zimmerman, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16, 109-110, 1983.