

KELSON ANGELINO ROSA

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCIEPTIVA DO ÁCIDO
ASCÓRBICO**

Florianópolis

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KELSON ANGELINO ROSA

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCIEPTIVA DO ÁCIDO
ASCÓRBICO**

Dissertação apresentada Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2006

"A mais bela de todas as certezas, é quando os fracos e desencorajados levantam suas cabeças e deixam de crer na força de seus opressores" (B.Brecht).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar persistência e perseverança para nunca desistir mesmo nas horas que achava que estava tudo perdido... Obrigado Senhor!

A minha mãe MARTA HELENA ROSA, sinônimo de muita garra, otimismo e perseverança, uma mulher que mistura sensibilidade, liderança e acima de tudo muito amor... Mãe, obrigado por tudo, te amo!

Um agradecimento em especial ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela oportunidade confiada, orientação, incentivo em todos os momentos, e acima de tudo por assumir vários papéis na minha vida (orientador, pai, irmão, colega de trabalho e o mais importante: Amigo)... Professor, Obrigado pela oportunidade.

Agradeço aos professores Dr (es). Ana Lúcia Severo Rodrigues, João Batista Calixto e Juliano Ferreira pela amizade, auxílio e ensinamentos.

À minha família, aos meus amigos e em especial a Adriana minha irmã-amiga que juntamente com sua família me receberam de braços abertos, desculpe pela ausência e obrigado por entender o motivo dela... a todos muito obrigado!

Agradeço a todos os colegas do laboratório e de curso pela amizade, auxílio e acolhida, especialmente aos amigos Vinicius de Maria Gadotti e Flavia Carla Meotti que foram de grande importância para realização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Nivaldo, secretário da pós-graduação, pela atenção e competência em todos os momentos.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Neurociências da UFSC pelos ensinamentos em especial aos professores Dr(s) Moacir Saralvo, Nelson Gabillan, Marcelo Farina e Alcir Dafré pela amizade e incentivo.

A PRPG e CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço também a todos aqueles que infelizmente não foram citados, mas que foram importantes de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a atividade antinociceptiva do ácido ascórbico (AA) em modelos comportamentais de nocicepção química e térmica em roedores e analisou alguns mecanismos que podem estar envolvidos em sua ação antinociceptiva. O AA, administrado pela via i.p., 30 min antes, causou inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pelo glutamato (GLU) com DI50 de 2,11 mg/kg e inibição de $63 \pm 5\%$. Quando co-administrado com GLU pela via i.pl. o AA também inibiu de forma dependente da dose a nocicepção causada pelo GLU com DI50 de 0,31 mg/kg e inibição de $83 \pm 4\%$. Contudo, em doses maiores o AA, tanto administrado via i.p. quanto via i.pl., perde parte de seu efeito antinociceptivo, sugerindo um efeito bifásico (curva em U). Em outra série de experimentos, o pré-tratamento dos animais com Chicago Blue Skay (CSB) (100 ng/pata, bloqueador não seletivo da captação de GLU 10 min antes pela via i.pl.) foi capaz de potencializar o efeito nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de GLU (0,03 mmol/pata, dose inativa), sendo que esta resposta foi completamente inibida pelo AA (3 mg/pata, co-administrado com GLU). Além disso, o CSB 10 min antes pela via i.pl. também potencializou a resposta nociceptiva induzida pelo GLU (10 μ mol/pata, dose ativa), sendo que esta resposta foi também completamente inibida pelo AA (3 mg/pata, co-administrado). O AA (1-5 mg/kg, i.p.) também inibiu de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela capsaicina, com DI50 de 2,49 mg/kg e inibição de $91 \pm 3\%$. O AA (0,03-10 mg/kg, i.p.) causou significativa inibição de ambas as fases da nocicepção causada pela formalina com valores de DI50 para as fases neurogênica e inflamatória de 4,05 e 3,24 mg/kg e inibições de 56 ± 4 e $60 \pm 7\%$, respectivamente. A antinocicepção causada pelo AA (0,1 mg/pata, co-administrado) e pela L-NOARG (inibidor da sintase do óxido nítrico, 10 mg/pata, co-administrado) na nocicepção causada pelo GLU foi significativamente revertido pelo pré-tratamento dos animais pela via i.pl., com L-arginina (precursor de óxido nítrico, 60 mg/pata). Da mesma forma, a antinocicepção causada pelo AA (0,1 mg/pata, co-administrado) e pelo DTNB (agente oxidante, 400 ng/pata, co-administrado) no modelo do GLU foram completamente (100%) bloqueadas pelo pré-tratamento dos animais pela via i.pl., 10 min antes, com ditiotreitol (DTT, 0,3 mg/pata, agente redutor). O pré-tratamento dos animais pela via i.p. com AA (3 mg/kg) reverteu de forma significativa tanto a hiperalgesia mecânica quanto a hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de adrenalina, substância P, bradicinina e carragenina com inibições 77 ± 13 ; 51 ± 17 ; 94 ± 6 e 100% (hiperalgesia mecânica) e 84 ± 14 ; 68 ± 10 ; 100; $64 \pm 14\%$ (hiperalgesia térmica), respectivamente. Por outro lado, o AA foi capaz de reverter apenas a hiperalgesia mecânica causada pela injeção i.pl. de PMA com inibição de 100%. No entanto, o AA não foi capaz de reverter nem a hiperalgesia térmica nem a hiperalgesia mecânica induzida pela prostaglandina E2. Em síntese, estes resultados indicam que o AA produz antinocicepção significativa e de forma dependente da dose em vários modelos de nocicepção por mecanismos que envolvem uma interação com sistema glutamatérgico, com a via da L-arginina-óxido nítrico, o sítio redox do receptor NMDA e com o sistema de transporte com o GLU, explicando pelo menos em parte a redução do efeito antinociceptivo do AA em doses maiores.

ABSTRACT

The present study evaluated the antinociceptive activity of Ascorbic Acid (AA) in behavioral models of mechanical and thermal nociception in rodents and analyzed some of the mechanisms involved on AA antinociceptive action. The AA given by i.p. route, 30 min earlier, produced a significant and dose-dependent inhibition of glutamate (GLU)-induced nociception with DI50 of 2.11 mg/kg and inhibition of $63 \pm 5\%$. When AA was co-administrated with GLU (i.pl) inhibited in a dose dependent way the GLU induced-nociception with DI50 of 0,31 mg/kg and inhibition of $83 \pm 4\%$. However, the highest doses of AA (i.p. and i.pl.) lose part of the antinociceptive effect, suggesting a bifasic effect (U curve). In another series of experiments, the pre-treatment of the animals with Chicago Blue Sky (CSB) (100 ng/paw, non-selective blocker of the GLU uptake 10 min before i.pl.) enhance nociceptive effect induced by GLU injection i.pl. (0,03mmol/paw, inactive dose), this response was completely inhibited by AA (3mg/paw, co-administrated with GLU). Moreover, the CSB 10 min. before (i.pl.) also enhance the nociceptive response induced by GLU (10 μ mol/paw, active dose), this response was completely inhibited by AA (3 mg/paw, co-administrated). The AA (1-5 mg/kg, i.p.) significantly and dose dependent inhibited the nociception induced by capsaicin, with DI50 of 2.49 mg/kg and inhibition of $91 \pm 3\%$. The AA (0,03-10 mg/kg, i.p.) caused a significant inhibition of both phases of formalin nociception, the values for DI50 for neurogenic and inflammatory phases were 4.05 and 3.24 mg/kg and inhibitions of 56 ± 4 and $60 \pm 7\%$, respectively. The antinociception caused by AA (0.1 mg/paw, co-administrated) and by L-NOARG (inhibitor of nitric oxide synthase, 10 mg/paw, co-administrated) on the nociception caused by GLU was significantly reverted by pre treatment of the animals (i.pl.) with L-arginine (nitric oxide synthase precursor, 60 mg/paw). In the same way, the antinociception caused by AA (0.1 mg/paw, co-administrated) and by DTNB (antioxidant agent, 400 ng/paw, co-administrated) in the model of GLU were completely (100%) blocked by pre-treatment of the animals (i.pl.), 10 min before, with dithiotreitol (DTT, 0.3 mg/paw, reducer agent). The animals pre-treatment (i.p.) with AA (3mg/kg) reversed significantly the mechanical and thermal hyperalgesia induced by adrenalin, substance P, bradykinin and carrageenin i.pl. injections, with inhibitions of 77 ± 13 ; 51 ± 17 ; 94 ± 6 and 100% (mechanical hyperalgesia) and 84 ± 14 ; 68 ± 10 ; 100 and $64 \pm 14\%$ (thermal hyperalgesia), respectively. In opposition, AA was capable of reverse just mechanical hyperalgesia caused by PMA i.pl. injection, with inhibition of 100%. But AA was not capable to reverse the thermal and mechanical hyperalgesia induced by prostaglandin E2. In summary, these results indicate that AA produced significant and dose dependent antinociception in several models of nociception by mechanisms that involve an interaction with glutamatergic, L-arginine-nitric oxide pathway, redox site of NMDA receptor and with the GLU transport system, explaining the reduction of the antinociceptive effect of AA in highest doses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese do ácido ascórbico em animais.....	12
Figura 2	Bioquímica do ácido ascórbico.....	13
Figura 3	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da capsaicina	29
Figura 4	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da formalina	30
Figura 5	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.pl. no modelo do glutamato	31
Figura 6	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da administração i.t. agonistas glutamatérgicos e SP.....	32
Figura 7	Efeito anti-hiperalgésico do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo de hiperalgesia induzida por bradicinina e SP.....	33
Figura 8	Efeito anti-hiperalgésico do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo de hiperalgesia induzida por adrenalina e carragenina.....	34
Figura 9	Efeito anti-hiperalgésico do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo de hiperalgesia induzida por prostaglandina e PMA.....	35
Figura 10	Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato.....	36
Figura 11	Influência do mecanismo Redox no pré-tratamento com DTT sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato.....	37
Figura 12	Influência dos transportadores de ácido ascórbico/glutamato no modelo do glutamato.....	38
Figura 13	Influência do pré-tratamento dos animais com CSB sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AGs	Agonistas glutamatérgicos
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
ATP	Trifostato de adenosina
BK	Bradicinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionada ao gene da calcitonina
CSB	Chicago sky blue
DI ₅₀	Dose inibitória em 50%
DTT	Ditiotreitol
DTNB	Ácido dinitrobenzóico
E.P.M.	Erro padrão da média
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
L-NOARG	N ^w -nitro-L-arginina
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PGE2	Prostaglandina
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
trans-ACPD	Ácido ($\pm$)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
V.O.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Ácido ascórbico.....	11
1.2	Dor.....	16
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Animais.....	23
3.2	Drogas e Reagentes.....	23
3.3	Testes comportamentais.....	24
3.3.1	Nociceção induzida pela capsaicina.....	24
3.3.2	Nociceção induzida pela formalina.....	24
3.3.3	Nociceção induzida pelo glutamato.....	25
3.3.4	Nociceção induzida por agonistas glutamatérgico e SP.....	25
3.3.5	Hiperalgesia induzida por mediadores inflamatórios.....	26
3.4	Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do ácido ascórbico.....	27
3.4.1	Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	27
3.4.2	Envolvimento do mecanismo redox.....	28
3.4.3	Envolvimento dos transportadores de ácido ascórbico/glutamato.....	28
3.5	Análise Estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Testes Comportamentais.....	29
4.1.1	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da capsaicina.....	29
4.1.2	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da formalina.....	29

4.1.3	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. e i.pl. no modelo da glutamato.....	30
4.1.4	Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo de administração i.t. de agonistas glutamatérgicos e SP.....	31
4.1.5	Efeito anti-hiperalgésico do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo de hiperalgesia induzida por mediadores inflamatórios e SP.....	32
4.1.6	Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do ácido ascórbico.....	36
4.1.6.1	Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato.....	36
4.1.6.2	Influência do mecanismo redox no pré-tratamento com DTT sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato.....	37
4.1.6.3	Influência dos transportadores de ácido ascórbico/glutamato no modelo do glutamato.....	38
5	DISCUSSÃO.....	40
6	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO ASCÓRBICO

Antigamente, nas grandes viagens marítimas, notou-se que os navegadores desenvolviam um tipo de patologia, a qual denominou-se escorbuto, sendo caracterizada pelo déficit de ácido ascórbico (AA). Esta patologia acontecia durante as viagens de longos meses em mar aberto. As principais refeições destes navegadores eram à base de produtos não perecíveis, conseqüentemente, suas dietas eram, em geral, ausentes de frutas frescas e vegetais. Assim, em 1753 um médico naval britânico documentou que algumas substâncias encontradas nas frutas cítricas possuíam a capacidade de curar o escorbuto. Ele então desenvolveu um método para concentrar e preservar o suco cítrico para ser usado nas grandes viagens. Desta forma, o britânico desenvolveu uma fórmula para o consumo diário de suco de limão para suprir a deficiência de AA e curar o escorbuto (NAIDU et al., 2003).

O AA foi primeiramente isolado de fontes naturais e caracterizado estruturalmente em 1932 por Svirebely e Szent-Gyorgyi e por Waugh e King, sendo, posteriormente, sintetizado por Haworth e Hirst no mesmo ano. Atualmente, o AA é muito usado como suplementação vitamínica pelo mundo inteiro (NAIDU et al., 2003).

As fontes de AA são frutas frescas como: laranja, limão, mamão papaia, dentre outras; e vegetais verdes, como brócolis, tomate, pimenta vermelha e verde, couve-flor e repolho (NAIDU et al., 2003). Muitas plantas e animais sintetizam o AA a partir da D-glicose e D-galactose, a maioria dos animais produz relativamente grandes níveis de AA a partir da glicose do fígado (Figura 1) (NAIDU et al., 2003). Entretanto, cobaia, morcegos, macacos e humanos que se alimentam de frutas não são capazes de sintetizar esta vitamina devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase.

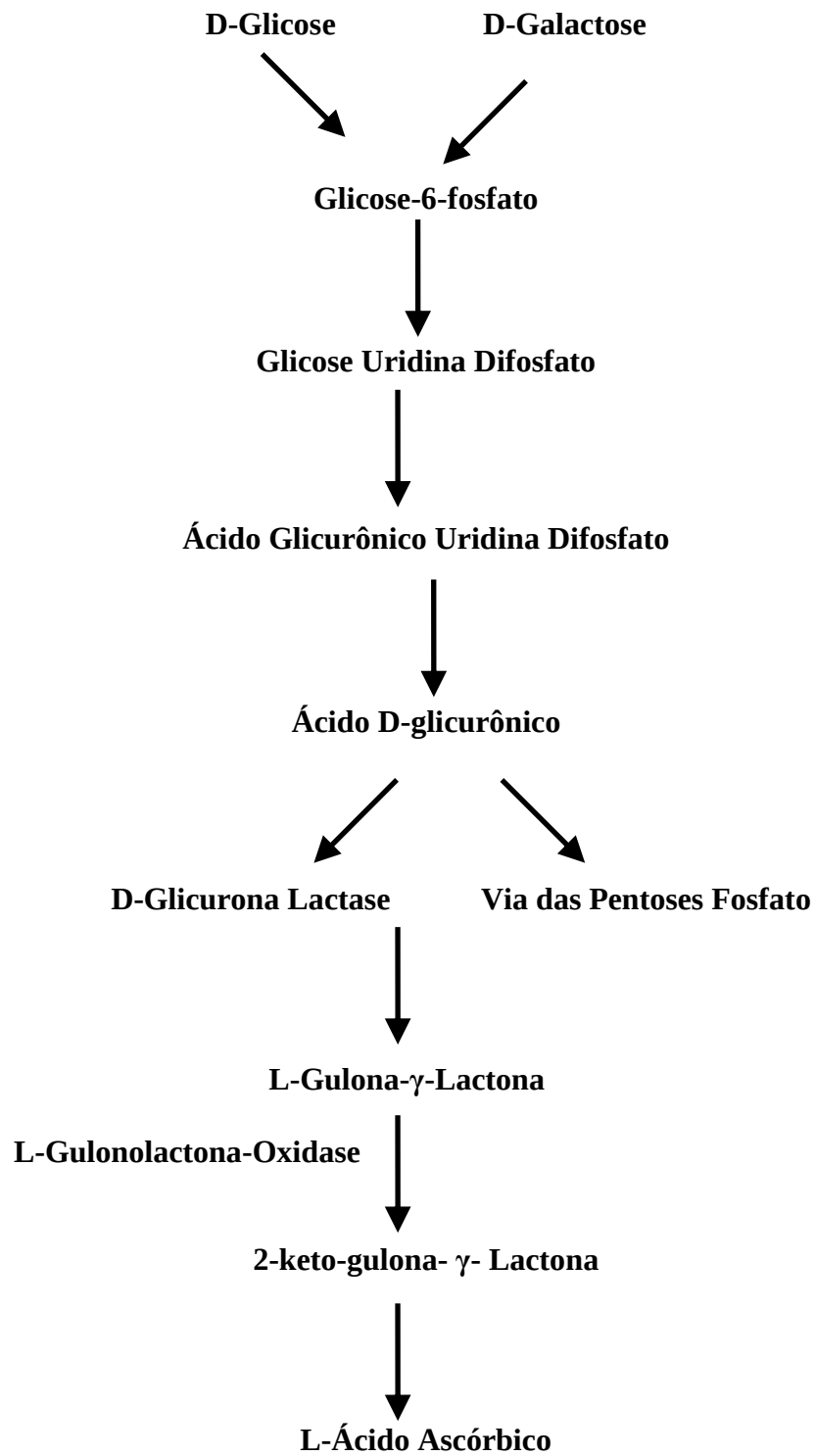


Figura. 1. Biossíntese do AA em animais. Fonte: NAIDU et al., 2003.

Em consequência, para estes animais o AA provém essencialmente da dieta. Em casos de doenças causadas pelo déficit desta vitamina, a suplementação pode ser feita através da ingestão de AA sob a forma de cápsulas, tabletes mastigáveis, pós-cristalinos, tabletes efervescentes e formas líquidas; as formas do AA tamponadas e esterificadas também são encontradas comercialmente, ambos, natural e sintético, são quimicamente identificados e têm diferenças em suas atividades biológicas e biodisponibilidade (NAIDU et al., 2003).

Em mamíferos, o AA é encontrado endogenamente na forma de ânion ascorbato. O AA é uma molécula antioxidante, portanto, doadora de elétrons. A oxidação do ascorbato acontece em um processo reversível de duas etapas: a primeira envolve a formação do radical ascorbil, semidehidroascorbato, via esta que ocorre a transferência de elétrons, seguido de uma rápida desprotonação. O elétron desemparelhado é deslocado com alta afinidade ao sistema de tricarbonil, produzindo semidehidroascorbato que é pouco estável. Embora ele possa reagir com outros radicais, usualmente decai para dehidroascorbato como mostrado na Figura 2.

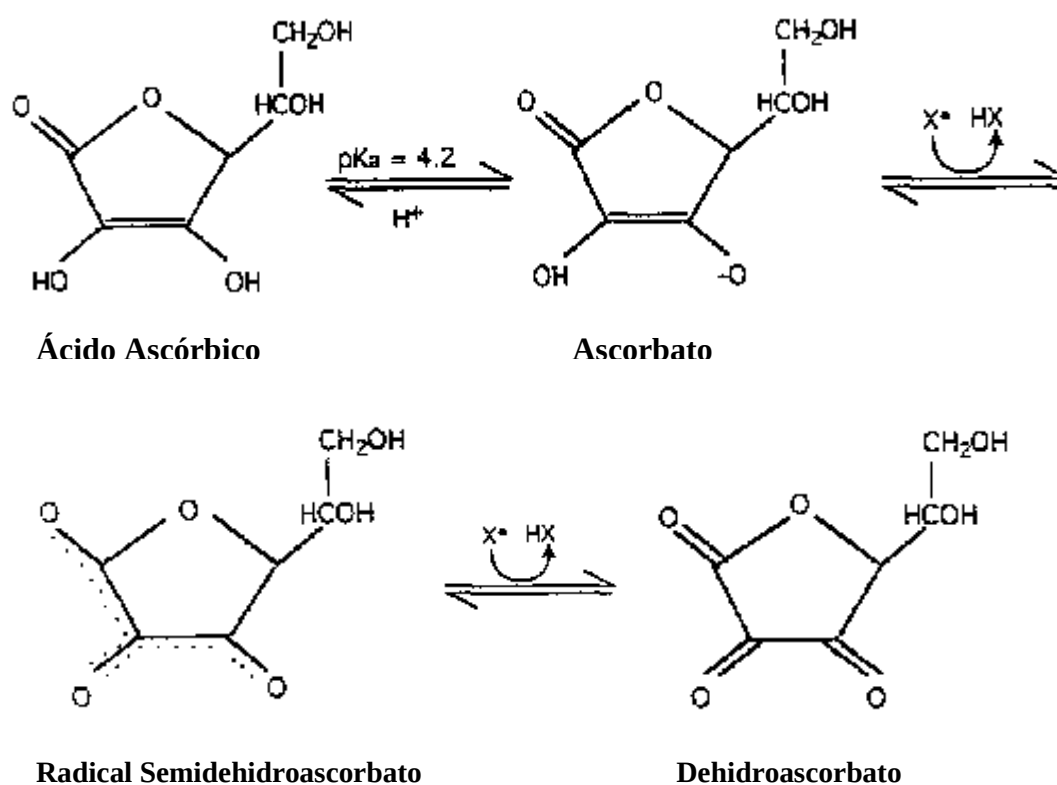


Figura 2. Bioquímica do AA. Fonte: Rebec, Pierce, 1994.

Uma série de outras reações enzimáticas converte o dehidroascorbato para oxalato e L-treonato que são excretados na urina. Interessantemente, o oxalato tem sido implicado na calcificação renal, uma vez que, dietas massivas de ascorbato podem promover algumas alterações fisiológicas conhecidas, dentre elas o cálculo renal (BRIGGS et al., 1973).

Em muitos casos, o ascorbato é oxidado por reagir rapidamente com espécies reativas de oxigênio (EROs), neutralizando-as. As EROs são produzidas normalmente durante o metabolismo celular e incluem radicais livres, incluindo o radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) entre outros. As EROs possuem uma grande reatividade e podem levar à oxidação de lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (PRATICÓ, DELANTY, 2000). Desta forma, as EROs podem ser tóxicas e determinantes do tempo de vida celular (PARKES et al., 1998). Atualmente, está demonstrado que os metabólitos das EROs estão associados com muitos processos degenerativos (JANSSEN et al., 1998; MELOV et al., 1998). Alterações no estado oxidativo do organismo têm sido implicadas em diversas desordens, tais como câncer, catarata, isquemia, enfisema pulmonar, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e cirrose hepática (COHEN, 1989; FLOYD, 1990; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990). No encéfalo, as EROs podem provocar a perda de neurônios dopaminérgicos que, conseqüentemente, está relacionada com a doença de Parkinson, além de produzir efeitos neurotóxicos causados pela excessiva liberação de glutamato, relacionada com distúrbios como esquizofrenia (COYLE, PUTTAFACKEN, 1993).

Diante destas informações, sugere-se um importante papel neuroprotetor do ascorbato, uma vez que, a neutralização das EROs pelo ascorbato confere um grau de proteção celular, sendo o ascorbato considerado um dos mais importantes antioxidantes nos sistemas biológicos. Assim, antioxidantes como os AA interrompem as reações de danos oxidativos doando um átomo de hidrogênio, proporcionando grande proteção contra estes derivados do oxigênio (PADAYATTY, 2003). Contudo, apesar do seu reconhecido papel antioxidante, em condições em que há excesso de ascorbato, ele pode assumir um papel pró-oxidante, promovendo deterioração oxidativa de lipídios de membrana e comprometendo seu papel como protetor (BUETTNER, MOSELEY, 1993).

Durante os últimos anos têm aumentado às evidências de que esta vitamina é um importante antioxidante endógeno, cofator enzimático e neuromodulador no sistema nervoso central (SNC). Apesar de muitas evidências deste papel, esta função específica permanece ainda obscura. Para entender a função do AA no SNC, é necessário compreender como esta molécula é compartimentalizada. O AA penetra no SNC por transporte ativo no plexo coróide

e difunde-se do fluido cérebro espinal para o fluido extracelular cerebral onde é concentrado e regulado homeostaticamente (RICE, 2000).

O encéfalo, medula espinal e glândulas adrenais têm grandes concentrações de ascorbato, bem como, grande capacidade de retê-lo. Sob condições normais, a difusão de ascorbato no encéfalo é em torno de 2% por hora, embora, sob condições de deficiência de ascorbato, essa difusão torna-se menor que 2% por dia (HUGHES et al., 1971). Assim, os níveis de ascorbato são fortemente controlados por regulação homeostática (HUGHES et al., 1971; SPECTOR, 1977). A captação do ascorbato pelo sangue dentro do líquido céfalo raquidiano (LCR) envolve transporte ativo, estéreo-específico e/ou dependente de sódio, no plexo coróide (SPECTOR, LORENZO, 1973). Além disso, o ascorbato também entra no compartimento extracelular encefálico pela captação através de carreadores e por difusão simples (LAM, DANIEL, 1986).

As funções fisiológicas do AA são largamente dependentes da sua propriedade de oxidação-redução. Esta vitamina é um cofator para as enzimas monoxigenases e hidroxilases envolvidas na síntese de colágeno, carnitina e neurotransmissores (LEVINE, 1986). O AA acelera a reação de hidroxilação, por manter o centro ativo do íon metálico em um estado reduzido ótimo para a atividade da enzima hidroxilase e oxigenase (REBEC, PIERCE, 1994).

Recentemente, têm-se demonstrado que o AA pode exercer importante efeito inibitório sobre a transmissão glutamatérgica, alterando a transmissão nociceptiva (RICE, 2000, ROSA et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que o AA está envolvido na modulação das funções do receptor NMDA através do sítio redox deste receptor (GOZLAN, BEM-ARI, 1995; MAJEWSKA et al., 1990; RICE, 2000). De fato, drogas moduladoras do receptor NMDA possuem indicações clínicas em dano cerebral isquêmico, trauma crânio-encefálico, epilepsia e analgesia (MILLAN, 1999). Contudo, antagonistas de receptores NMDA possuem efeitos adversos que comprometem o uso destas substâncias (BORIS et al., 2000). Desta forma, o uso para fins analgésicos de drogas moduladoras do receptor NMDA ainda é limitado devido aos efeitos colaterais dos produtos disponíveis, particularmente, efeitos psicomiméticos e alterações motoras (EISEMBERG et al., 1993; MILLAN, 1999; SKOLNICK, 1999).

1.2 DOR

As sensações que chamamos de dor, formigamento, queimadura são características das submodalidades das sensações somáticas (KANDEL et al., 2001). A dor, além de uma sensação, é uma experiência associada a condição e estado emocional, definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER, MELZACK, 1999).

As experiências dolorosas incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS, BASBAUM, 2001).

O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual. A nocicepção é a progenitora da dor, que por sua vez causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme, a modalidade da dor e o início das respostas protetoras são determinados por muitos fatores na medula espinal e também em estruturas encefálicas superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO, BRODE, 1998).

Existem várias fontes importantes onde mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa são gerados, das quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células imunes, nervos simpáticos e sensoriais, entre outras. Além disso, existem mecanismos complexos pelos quais os transmissores podem agir, via múltiplos receptores que são amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais (MILLAN, 1999).

Desta forma, a dor pode ser denominada em termo de duração como dor aguda ou crônica. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a alguma lesão tecidual. Se persistir mais que alguns dias ou semanas, passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou doença, podendo permanecer mesmo depois da recuperação do indivíduo (LOESER, MELZACK, 1999). Frequentemente a dor torna-se crônica e debilitante em substituição a sua função de atuar como um sistema de aviso. Esta transição para a fase crônica envolve mudanças na medula espinal e cérebro, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas no nível do neurônio sensorial primário (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Quanto ao tipo de dor, ela pode ser classificada em “neurogênica” que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central. Enquanto a “dor neuropática” acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos e a “dor psicogênica” pode refletir de fatores psicológicos e não é oriunda de uma fonte somática identificável (MILLAN, 1999). A percepção do estímulo nociceptivo em nível periférico se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas das fibras sensoriais, denominadas nociceptores. Os nociceptores estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. A pele é responsável por fornecer a maioria das informações nociceptivas da periferia ao SNC, pois a maior parte dos estímulos nociceptivos é captado neste tecido. Além disso, os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos (BESSON, CHAOUCH, 1987; BESSON, 1999; DRAY, 1997; MILLAN, 1999). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos, que são uma pequena proporção das fibras aferentes, as quais normalmente não são responsivas a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios endógenos ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários, onde se encontram os terminais nociceptivos, estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Ao sair de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar ramificações simultaneamente para a medula espinal e para os tecidos corporais. Além disso, os neurônios aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. Conseqüentemente, neurônios com mais mielina, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução são conhecidos como fibras A β , que respondem mais rapidamente ao leve toque (JULIUS, BASBAUM, 2001).

As fibras A β são encontradas nos nervos que inervam a pele e normalmente não contribuem na resposta nociceptiva. Entretanto, a estimulação dessas fibras pode aliviar a dor, é o que ocorre quando elas são ativadas por fricção da pele pela mão após alguma lesão (KANDEL et al, 2001). Existem ainda outros dois tipos de fibras aferentes primárias responsáveis pela transmissão da sensação da periferia à medula espinal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C não mielinizadas e as fibras poucos mielinizadas A δ . Estas fibras são as responsáveis por transmitir o estímulo

nociceptivo. No entanto, a condução ocorre de forma mais lenta do que aquela observada para as fibras A β (BESSON, CHAOUCH, 1987; MILLAN, 1999).

A ativação dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos (frio ou calor), estímulos mecânicos com intensidade suficiente para ativar as fibras nociceptivas ou por uma série de irritantes químicos. Porém, a atividade destas fibras e sua fisiologia dependem de fatores controlados endogenamente, como os mediadores químicos inflamatórios produzidos na lesão tecidual (BESSON, 1997; BESSON, 1999; COGGESHALL, CARLTON, 1997; DRAY et al., 1994; DRAY, 1997; GUIRIMAND, LE BARS, 1996; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Após lesões teciduais, vários mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (BESSON, 1997). Assim, neurotransmissores e neuromoduladores como substância P (SP), trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y (NPY), colecistocinina (CCK), neurotrofinas, bombesina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), opióides, somatostatina, acetilcolina, prótons, adenosina, bradicinina, histamina, serotonina, glutamato e outros aminoácidos excitatórios podem ser liberados (HILL, 2001).

Grande parte da ativação destas fibras é produzida por receptores específicos acoplados a cascatas de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. A ativação destas fibras altera o mecanismo de excitação da membrana e em consequência pode alterar a bioquímica dos neurônios sensoriais. Além disso, estas alterações podem causar aumento ou diminuição da produção de mediadores químicos (por exemplo, bradicinina), expressão de canais iônicos (por exemplo, canais de Na⁺) e receptores (por exemplo, NK₁ para a Substância P, receptores de glutamato, entre outros), bem como na indução de enzimas (por exemplo, iNOS). Muitas substâncias causam ativação direta dos nociceptores (por exemplo, bradicinina, ATP, capsaicina) causando assim uma dor de característica aguda (BESSON, 1997; BESSON, 1999; COGGESHALL, CARLTON, 1997; DRAY, 1997; GUIRIMAND, LE BARS, 1996; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Assim, o conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e de drogas envolvidas na modulação central e periférica da nocicepção (LEVINE, TAIWO, 1994; MILLAN, 1999; RANG et al., 1994; WOOD, DOCHERTY, 1997). Além disso, é importante mencionar que alguns tipos de dores, principalmente as dores crônicas, também podem ser

controlados com droga que atuam em transtornos neuropsiquiátricos, como é o caso dos antidepressivos (KORZENIEWSKA-RYBICKA, PLAZNIK, 1998; MILLAN, 1999).

Recentemente ocorreu substancial progresso no conhecimento dos eventos regulatórios ao nível da transcrição gênica, extremamente importante na modulação da nocicepção, notadamente na dor crônica. É possível que analgésicos do futuro possam ter alguma intervenção neste nível, a partir do momento em que os mecanismos bioquímicos de controle da transcrição tornarem-se mais conhecidos. Tem sido bastante desafiador para os pesquisadores o esclarecimento dos mecanismos de modulação, envolvendo as diversas interações entre os diferentes mediadores e como tais eventos influenciam na transcrição gênica. Certamente que o domínio desses conhecimentos poderá trazer importantes informações para o desenvolvimento dos analgésicos do futuro (MACFARLANE et al., 1997; MILLAN, 1999; SKOLNICK, 1999).

Vários estudos têm estabelecido que uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal, normalmente pode decorrer do aparecimento de novos canais iônicos e receptores. Sendo assim, substâncias capazes de causar modificações seletivas destes processos podem dar origem a novos agentes analgésicos e antiinflamatórios (BESSON, 1997; BESSON, 1999; COGGESHALL, CARLTON, 1997; DRAY et al., 1994; DRAY, 1997; GUIRIMAND, LE BARS, 1996; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

Desta forma, os mediadores químicos que são liberados após diferentes estimulações nociceptivas fazem com que a informação seja levada através das fibras aferentes ao SNC, para que seja processada e uma resposta adequada seja enviada. Os impulsos nociceptivos chegam através dos neurônios aferentes primários na medula espinhal, diretamente no corno dorsal, área primária de recebimento da maioria das informações somatossensoriais (COGGESHALL, CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula é dividido em lâminas com base em sua citoarquitetura. As fibras aferentes primárias C e A δ têm suas terminações principalmente nas lâminas mais superficiais [lâmina I (zona marginal) e lâminas II (substância gelatinosa)] (BESSON, CHAOUCH, 1987). A partir daí, a informação nociceptiva é levada do corno dorsal da medula para o tálamo via neurônios de segunda ordem, ou neurônios sensoriais secundários, que são conhecidos como as vias ascendentes. Estes neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais sensoriais pela liberação de glutamato e SP, principalmente, além de depender também de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores (HILL, 2001).

Assim, as vias ascendentes mais importantes na transmissão da dor são: o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico entre outros. Desta forma, após a estimulação de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, amígdala e encéfalo, aonde a informação que chega é integrada com experiências do passado e processada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada que é enviada para a medula espinal através dos neurônios descendentes, compreendendo um mecanismo intrínseco de controle da dor (BESSON, 1999; CRAIG, DOSTROVSKY, 1999; GUYTON, 1992; MILLAN 1999). Além disso, a modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas encefálicas, e desta forma vários sistemas de neurotransmissores, dentre os quais, podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (para revisão ver MILLAN, 2002).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório, está envolvido na percepção e perpetuação da resposta de dor, via ativação de subtipos de receptores glutamatérgicos, dentre estes o receptor do subtipo NMDA. A ativação dos receptores NMDA promove um influxo de cálcio que por sua vez, ativa os mecanismos intracelulares dependentes deste íon, entre eles, a atividade da óxido nítrico sintase (NOS) levando ao aumento da produção do óxido nítrico a partir da L-arginina. Neste sentido, vários estudos demonstraram que inibidores da NOS e antagonistas de receptores NMDA são capazes de reverter certos estados de dor patológica; esta observação suporta a idéia de que a via do NMDA/óxido nítrico apresenta um importante papel no desenvolvimento de vários processos fisiopatológicos envolvidos nos estados de dor aguda e crônica, como a alodinia e a hiperalgesia (YONEHARA, et al, 2003).

Evidências experimentais também sugerem que o receptor NMDA está envolvido na sensibilização central e na hiperalgesia secundária, pelo fato que, os antagonistas dos receptores NMDA, como o AP5 e dizocilpina (MK801), previnem o fenômeno de facilitação central na medula espinal e acredita-se que possam ter um importante papel na hiperalgesia inflamatória (DICKENSON, 1995; DRAY et al., 1994; 1997; MILLAN, 1999; WOOLF, 1994). Além disso, quando estes antagonistas são administrados pela via intratecal apresentam atividade analgésica em vários modelos animais de nocicepção (MILLAN, 1999).

Por outro lado, drogas capazes de antagonizar o receptor NMDA são dotadas de efeitos adversos significativos. Neste sentido, novas substâncias que possam atuar neste sistema, sem causar efeitos colaterais consideráveis, poderão constituir-se em drogas ou

protótipos importantes no controle da dor (EISEMBERG et al., 1993; MILLAN, 1999; SKOLNICK, 1999).

Diante disso, vários estudos têm demonstrado que o AA pode estar envolvido na modulação das funções do receptor NMDA através de um mecanismo redox (GOZLAN, BEM-ARI, 1995; MAJEWSKA et al., 1990; RICE, 2000). Sendo assim, o estudo das propriedades antinociceptivas do AA torna-se de extrema importância, tendo em vista, que este antioxidante pode atuar como um possível neuromodulador endógeno, alterando a atividade do receptor NMDA, o qual está diretamente envolvido com a transmissão nociceptiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a possível atividade antinociceptiva do AA na nocicepção química e térmica através de estudos farmacológicos “in vivo”, utilizando diferentes modelos experimentais de nocicepção em roedores.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antinociceptiva do AA, administrado sistemicamente, no modelo de nocicepção induzido pela injeção intraplantar de formalina, capsaicina e glutamato em camundongos.

- Verificar a atividade antinociceptiva do AA, administrado sistemicamente, no modelo de nocicepção induzido pela injeção i.t. de glutamato, agonistas glutamatérgicos específicos e substância P em camundongos.

- Verificar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico, do sítio redox do receptor NMDA e dos transportadores de glutamato na atividade antinociceptiva do AA, através da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

- Analisar o efeito anti-hiperalgésico do AA, administrado sistemicamente, no modelo de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de mediadores inflamatórios ou de indutores da inflamação (carragenina, adrenalina, substância P, prostaglandina, bradicinina e PMA) em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços de ambos os sexos (25 a 35 g) e ratos “Wistar” (170-250 g), de ambos os sexos obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6:00h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo 23080.005145/2003-19).

3.2 Drogas e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: formalina (Merck, Darmstadt, Germany); N^o-nitro-L-arginina, hidrocloreto de L-arginina, hidrocloreto de D-arginina, capsaicina, hidrocloreto de ácido L-glutâmico, ácido cálnico (cainato), ácido ($\pm$)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] (MK-801), Ditioneitol, Ácido dinitrobenzóico (DTT), Chicago sky blue (CSB), Prostaglandina E₂ (PGE₂), adrenalina, carragenina, bradicinina e AA (Sigma, St. Louis, USA); (PMA) forbol 12-miristato 13-acetato (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA), cloreto de sódio (LabSynth, Diadema, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidas imediatamente antes do uso em solução salina (0,9%), com exceção da capsaicina que foi dissolvida em 10% etanol, 10% tween 80 e 80% salina, no entanto, a concentração final de etanol não excedeu 5%, não causando efeito *per se*.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Nocicepção induzida pela capsaicina

Este modelo foi proposto por Sakurada e colaboradores (1992) e se presta ao estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção intraplantar (i.pl.) de capsaicina induz a ativação dos receptores vanilóides, promovendo assim a estimulação direta dos neurônios nociceptivos e liberação de várias substâncias envolvidas na transmissão dolorosa (SANTOS, CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 1996, 2003). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação do AA com a nocicepção de origem neurogênica.

Os camundongos foram colocados individualmente dentro de funis de vidro transparentes para adaptação durante um período de 20 min, em seguida, receberam uma injeção de 20 µl de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na região ventral da pata posterior direita. Imediatamente após a injeção, cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com a solução de capsaicina durante 5 min, este tempo foi considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com AA (0,01-5 mg/kg) via i.p. 30 min antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.).

3.3.2 Nocicepção induzida pela formalina

Para confirmação e melhor compreensão do efeito antinociceptivo do AA foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina. Esse é um modelo que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR, HOLE, 1987, TJØLSEN et al., 1992). O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito (SANTOS, CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1999). Os animais receberam 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região ventral da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram colocados em funis de vidro individuais em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a injeção de formalina. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi

cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com AA pela via i.p. (0,3-10 mg/kg) 30 min antes da injeção de formalina. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg, i.p.).

3.3.3 Nocicepção induzida pelo glutamato

Este modelo se presta ao estudo de drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico (BEIRITH et al., 2002). Este sistema de neurotransmissão é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nocicepção tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL, NEECK, 2001). Além disso, a injeção i.pl. de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando assim a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos também envolvidos na transmissão nociceptiva (BEIRITH et al., 2003).

Sendo assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva do AA. Para isso os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e logo após receberam 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita. Durante os 15 min subseqüentes, foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato, o qual foi considerado como indicativo de nocicepção (BEIRITH et al., 2002). Os animais foram tratados com AA pela via i.p. (1-5 mg/kg, 30 min antes). Em outra série de experimentos, os animais foram tratados com AA (0,01-3 µg/pata, co-administrado com o glutamato) e procedeu-se a análise da nocicepção conforme descrito acima. Grupos controles foram tratados com solução salina (20 µl/pata).

3.3.4 Nocicepção induzida por agonistas seletivos dos receptores glutamatérgicos e Substância P.

Para confirmar, compreender e obter dados adicionais sobre o mecanismo de ação antinociceptiva do AA foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção i.t. de agonistas glutamatérgicos e SP. As injeções dos agonistas foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos, de acordo com método

descrito por HYLDEN e WILCOX (1980). Uma agulha, conectada a uma micro-seringa (25 µl) por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele e fixada entre as vértebras no espaço subdural dos segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 µl das drogas ou veículo. A resposta nociceptiva foi induzida por SP (0,1 nmol/sítio, i.t.), trans-ACPD (agonista metabotrópico, 50 nmol/sítio, i.t.), AMPA (agonista seletivo de receptores AMPA, 135 pmol/sítio, i.t.), glutamato (agonista não-seletivo, 175 nmol/sítio, i.t.), cainato (agonista seletivo de receptores cainato, 110 pmol/sítio, i.t.) ou N-metil-D-aspartato (agonista seletivo de receptores NMDA, 450 pmol/sítio, i.t.) (SCHEIDT et al., 2002). A injeção intratecal dos agonistas glutamatérgicos e da SP causam uma reação comportamental de nocicepção direcionada a região caudal. A reação nociceptiva foi definida como um único movimento de cabeça direcionada a parte posterior do corpo mordendo ou lambendo os membros posteriores (patas posteriores, cauda e abdômen), que resulta em contato do focinho do animal com a região alvo. O tempo de reação nociceptiva direcionada a região caudal foi avaliado em períodos apropriados para cada droga: glutamato (3 min); NMDA e substância P (5 min); AMPA (1 min); cainato (4 min) e trans-ACPD (15 min). O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região posterior do corpo foi quantificado cumulativamente com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

3.3.5 Hiperalgisia induzida por mediadores inflamatórios.

O possível efeito anti-hiperalgésico do AA foi avaliado usando o procedimento previamente descrito (HARGREAVES, 1998; OTUKI et al., 2005; RANDALL, SELITTO 1957). Os animais foram pré-tratados via intraperitoneal com o AA (3 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg – grupo controle), 30 min antes da injeção na pata direita de 0,1 ml de PGE₂ (10 nmol/pata), PMA (0,1 nmol/pata), BK (3 nmol/pata), adrenalina (100 ng/pata), SP (13,5 µg/pata), carragenina (300 µg/pata) ou somente salina. A hiperalgisia foi avaliada 30 min depois, com exceção da carragenina que foi analisada 3,5 h após. Os animais tratados com BK foram pré-tratados com um inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captropil (5 mg/kg, s.c.), uma hora antes do experimento, para prevenir a sua degradação (MENDES et al., 2000).

A resposta hiperalgésica induzida pelos agentes flogísticos foi avaliada pela aplicação crescente de uma pressão ou de temperatura na superfície plantar da pata direita dos animais, conforme o método previamente descrito (RANDALL, SELITTO 1957; HARGREAVES et

al., 1998). A pressão do aparelho de hiperalgesia mecânica (Ugo Basile, Milan, Itália) pode variar de 0 a 750 g. A resposta hiperalgésica foi analisada em função da capacidade do rato em suportar a pressão exercida pelo aparelho em sua pata. Já para a análise da hiperalgesia térmica, os animais foram habituados ao aparelho de mensuração (Ugo Basile, Milan, Itália), por aproximadamente 10 min antes dos experimentos. Foi avaliado o tempo que o animal permaneceu com a pata sobre uma fonte de calor radiante. O tempo máximo estabelecido foi de 20 segundos para evitar assim, danos teciduais. A intensidade de luz foi ajustada de forma a obter uma latência basal entre 10 e 15 segundos.

3.4 Análise do mecanismo ação antinociceptiva do ácido ascórbico.

De acordo com os resultados obtidos nos modelos de nocicepção anteriormente descritos, a etapa subsequente deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo do AA. Para este fim, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. O AA foi administrado pela via i.pl., previamente, ou co-administrado com glutamato e as doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura ou então, baseadas em resultados prévios do laboratório.

3.4.1 Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico

Com o objetivo de evidenciar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva do AA, os animais foram pré-tratados com L-arginina (precursor de óxido nítrico, 60 µg/pata, i.pl.), ou veículo (solução salina 20 µl, i.pl.) 15 min antes da administração do AA (3 µg/pata, co-administrado com glutamato) ou de L-NOARG (inibidor da óxido nítrico sintase, 10 µg/pata, co-administrado com glutamato) conforme descrito anteriormente por Santos e colaboradores (1999) e adaptado a partir de resultados prévios obtidos no nosso laboratório. Após o tratamento dos animais com AA ou com L-NOARG, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo glutamato. Grupos de animais controles foram tratados com veículo ou L-arginina 15 min antes da injeção de glutamato.

3.4.2 Envolvimento do Mecanismo Redox

Com o objetivo de verificar o envolvimento da modulação do sítio redox do receptor NMDA sobre a antinocicepção causada pelo AA, os animais foram pré-tratados com DTT (0,3 µg/pata, agente redutor). Após 10 min, estes animais receberam por via i.pl., o AA (0,1 µg/pata) ou DTNB (400 ng/pata, agente oxidante) ambos co-administrados com o glutamato. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi tomado como indicativo de nocicepção. As doses do DTT e DTNB foram escolhidas com base em experimentos prévios do nosso grupo e doses encontradas na literatura (LAUGHLIN et al., 1998).

3.4.3 Envolvimento dos transportadores de ácido ascórbico/glutamato.

Com objetivo de verificar o envolvimento do sistema de captação de glutamato na ação antinociceptiva do AA, os animais foram pré-tratados com CSB (100 ng/pata, bloqueador da captação de glutamato) 10 min antes da co-administração do AA (3 µg/pata) com glutamato em uma dose subativa (0,3 nmol/pata). Em outra série de experimentos, os animais foram pré-tratados com CSB 10 min antes da co-administração do AA com glutamato em uma dose ativa (10 nmol/pata). A dose de CSB foi escolhida com base em experimentos prévios do nosso grupo e doses encontradas na literatura (BEIRITH et al., 2002).

3.5 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI₅₀ (doses de AA que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls, quando apropriado. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI₅₀ foram obtidos através do método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Instat[®] (1994, San Diego, CA) versão 2.05.

4. RESULTADOS

4.1 Testes comportamentais

4.1.1 Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da capsaicina

Os dados apresentados na Figura 3 indicam que o tratamento dos animais com AA pela via i.p. produziu uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção neurogênica induzida pela capsaicina, com valor de DI_{50} de 2,49 (1,86-3,32) mg/kg e inibição de $91 \pm 3\%$.

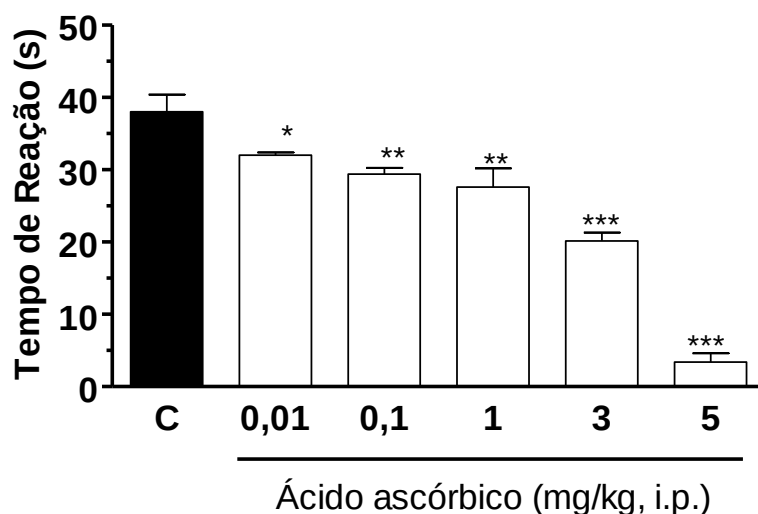


Figura 3: Efeito antinociceptivo do AA (0,01-5 mg/kg) administrado pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela capsaicina (1,6 μ g/i.pl.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (C).

4.1.2 Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo da formalina

A Figura 4 demonstra que o tratamento dos animais com o AA (0,3-10 mg/kg, i.p.) foi capaz de inibir de maneira significativa e dependente da dose a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de formalina, tanto a nocicepção de origem neurogênica quanto

inflamatória. Os valores de DI_{50} para a primeira fase (nocicepção neurogênica) e segunda fase (nocicepção inflamatória) foram de 4,05 (3,75-4,37) e 3,24 (2,25-4,67) mg/kg e inibições de 56 ± 4 e $60 \pm 7\%$, respectivamente. Além disso, é importante mencionar que a maior dose do AA, utilizada neste modelo, apresentou menor efeito antinociceptivo se comparado com a dose menor tanto na primeira quanto na segunda fase da nocicepção causada pela formalina (Figura 4).

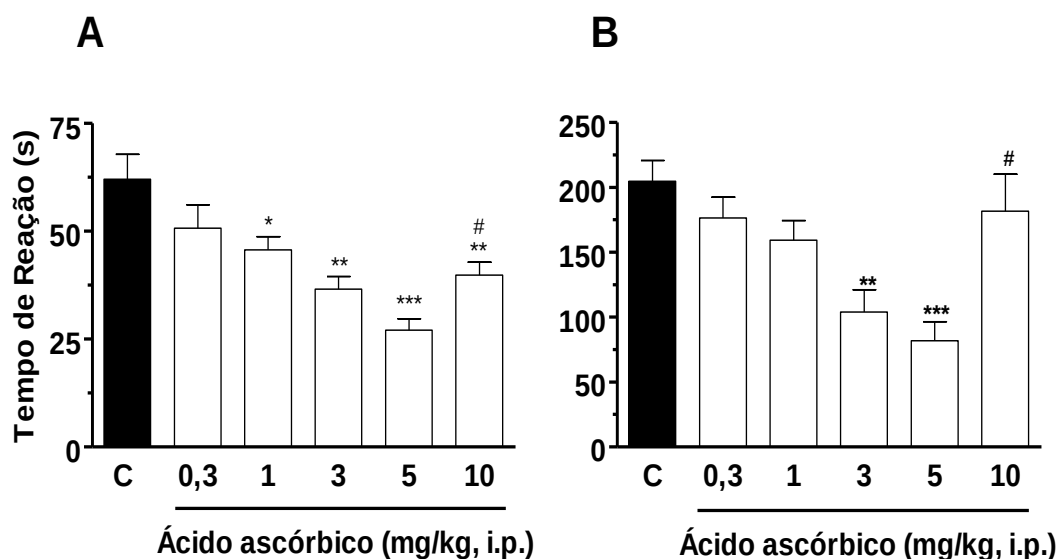


Figura 4: Efeito antinociceptivo do AA (0,3-10 mg/kg) administrado pela via i.p. em relação à primeira (A) e segunda (B) fases da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C). # $P < 0,01$ difere significativamente em relação à dose de 5 mg/kg.

4.1.3 Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico administrado pela via i.p. e i.pl. no modelo da glutamato

Os resultados apresentados na Figura 5 (A e B) demonstram que o AA, tanto administrado pela via i.p. quanto co-administrado com glutamato via i.pl., foi eficaz em inibir de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato. Os valores de DI_{50} calculados foram de 2,11 (1,90-2,34) mg/kg e 0,31 (0,26-0,38) μ g/pata com inibições de $63 \pm 5\%$ e $83 \pm 4\%$, respectivamente. Outro aspecto importante que deve ser mencionado é que, a exemplo, do que ocorreu no teste da formalina, o AA, administrado tanto pela via i.p. ou em associação com o glutamato, na maior dose utilizada apresentou menor efeito antinociceptivo no teste do glutamato, sugerindo que em doses maiores o AA pode apresentar um efeito pró-nociceptivo ou pode estar facilitando de alguma

forma mecanismos celulares que levariam a estimulação das fibras sensoriais e conseqüentemente causariam a nocicepção (Figura 5).

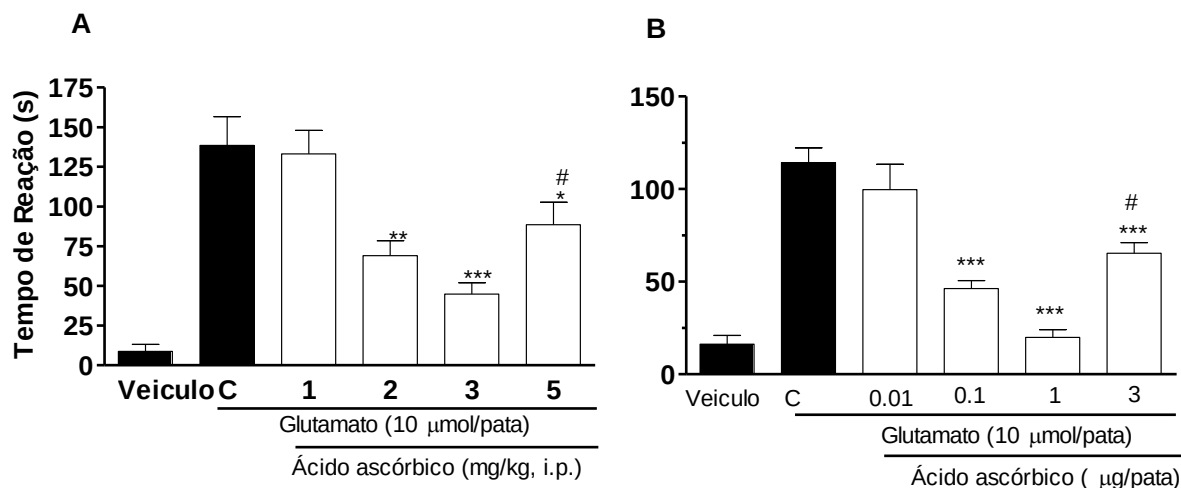


Figura 5: Efeito antinociceptivo ácido ascórbico administrado pela via i.p. (1-5 mg/kg) (A) ou co-administrado (0,01-3 µg/pata) com o irritante (B) em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 µmol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C) e # $P < 0,01$ difere significativamente em relação às doses de 3 mg/kg e 1 µg/pata.

4.1.4 Efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo de administração i.t. de agonistas glutamatérgicos e SP

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que o AA, administrado pela via i.p. (3 mg/kg), causou inibição significativa da nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA, AMPA, cainato e SP, com inibições de $49 \pm 9\%$, $42 \pm 7\%$, $34 \pm 8\%$, $38 \pm 5\%$ e $65 \pm 8\%$, respectivamente. Em contrapartida, o AA no mesmo esquema de tratamento não produziu efeito antinociceptivo contra a nocicepção induzida pelo *trans*-ACPD (agonista metabotrópico) (Figura 6).

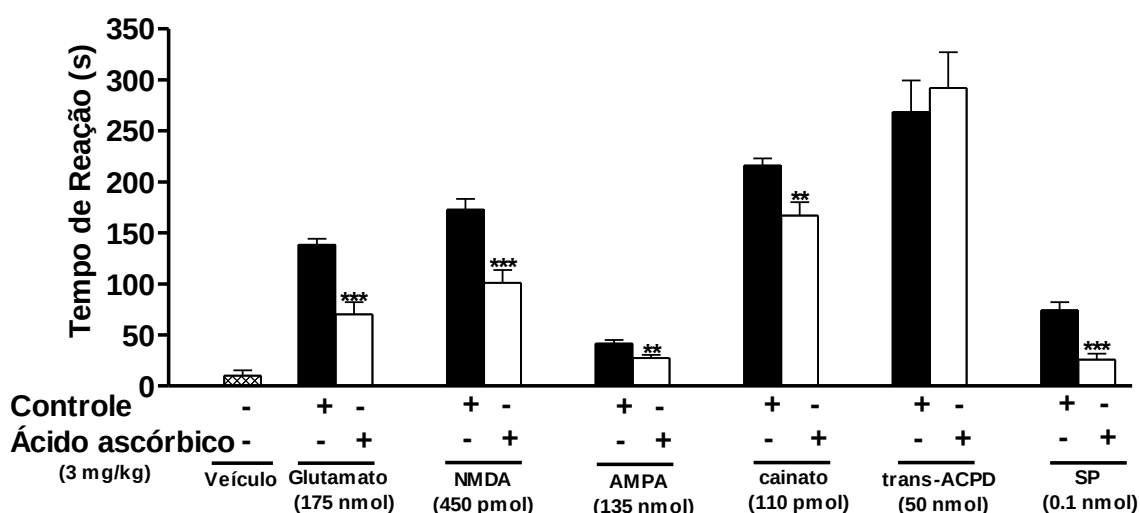


Figura 6: Efeito antinociceptivo do AA administrado pela via i.p. em relação a nocicepção induzida pela injeção i.t. de agonistas glutamatérgicos e SP em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. **P < 0,01; ***P < 0,001 difere significativamente em relação aos grupos controles (barras cheias).

4.1.5 Efeito anti-hiperalgésico do ácido ascórbico administrado pela via i.p. no modelo de hiperalgesia induzida por mediadores inflamatórios e SP.

No modelo de hiperalgesia mecânica descrito por Randall-Selitto e no modelo de hiperalgesia térmica descrito por Hargreaves, o AA (3 mg/kg, i.p., 30 min antes) reverteu tanto a hiperalgesia mecânica quanto a térmica induzida pela injeção i.pl. de BK (3,2 µg/pata), SP (13,5 µg/pata) (Figura 7), com inibições de 75±14 e 92±7%; 44±17 e 84±15%, respectivamente; bem como a resposta causada pela adrenalina (100 ng/pata) e carragenina (300 µg/pata) (Figura 8) com inibições de 72±9 e 80±11%, 100% e 47±13%, respectivamente. Além disso, o mesmo tratamento dos animais com a AA também foi capaz de reverter de forma significativa apenas a hiperalgesia mecânica induzida pelo PMA (0,1 nmol/pata) com inibição de 100%, e não foi capaz de reverter tanto a hiperalgesia térmica quanto a mecânica induzida pela PGE₂ (10 nmol/pata) (Figura 7).

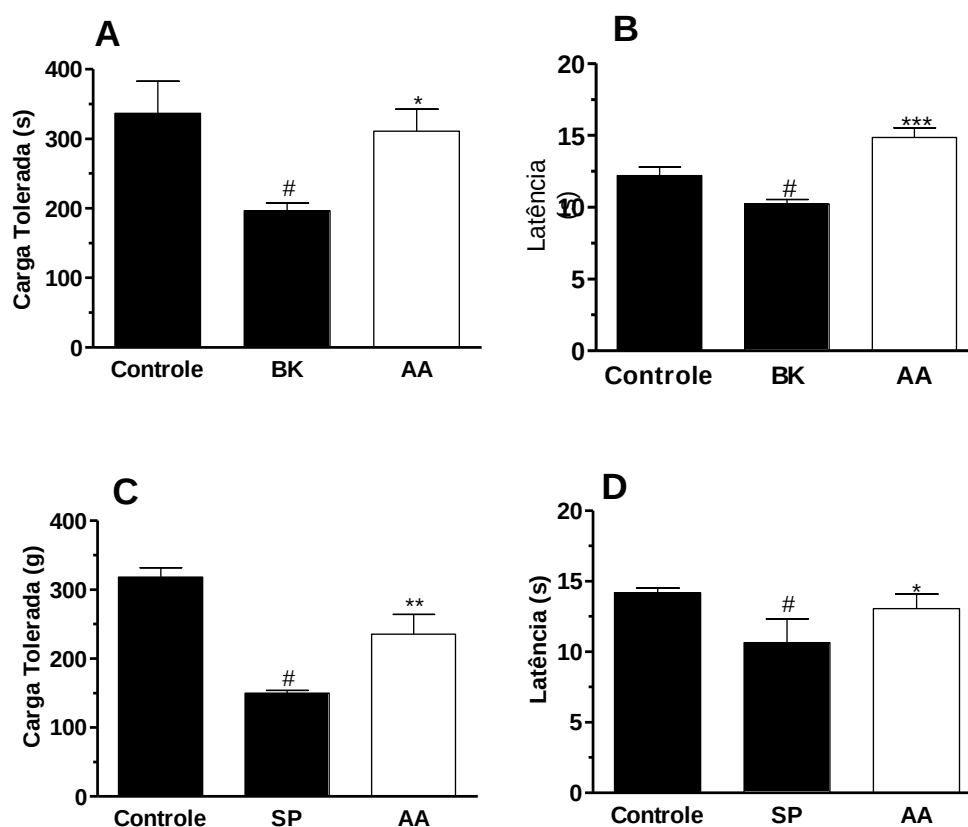


Figura 7: Efeito do AA (3 mg/kg, i.p.) na hiperalgesia mecânica (**A** e **C**) e térmica (**B** e **D**) induzida pela injeção intraplantar de bradicinina (BK, 3 µg/pata), SP (13,5 µg/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média ± S.E.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ diferem significativamente do grupo dos animais tratados com o agonista (BK ou SP) e # $P < 0,001$ difere significativamente do grupo de animais tratados com controle (salina).

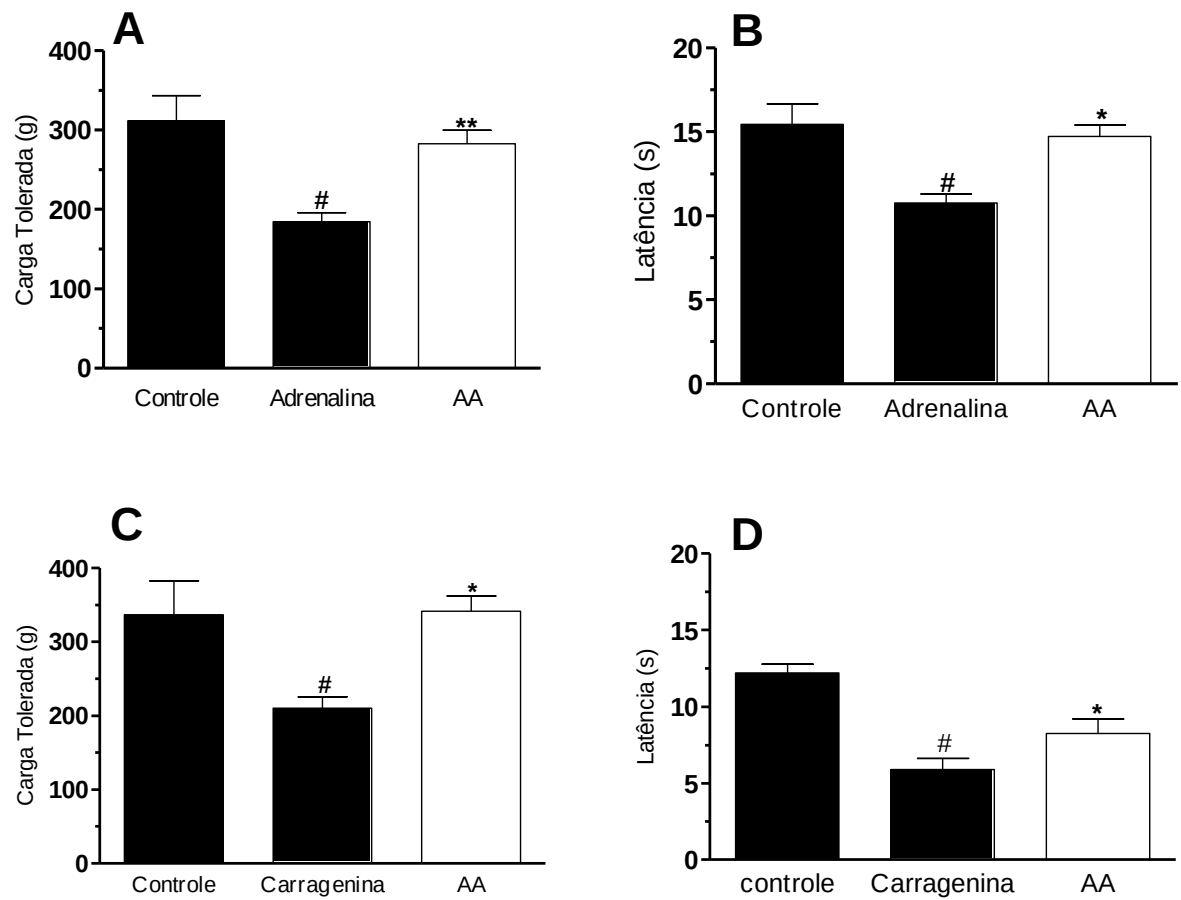


Figura 8: Efeito do AA (3 mg/kg, i.p.) na hiperalgesia térmica (**A e C**) e mecânica (**B e D**) induzida pela injeção intraplantar de adrenalina (10 ng/pata) e carragenina (300 µg/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ diferem significativamente do grupo dos animais tratados com o agonista (Adrenalina e Carragenina) e # $P < 0,001$ difere significativamente do grupo de animais tratados com controle (salina).

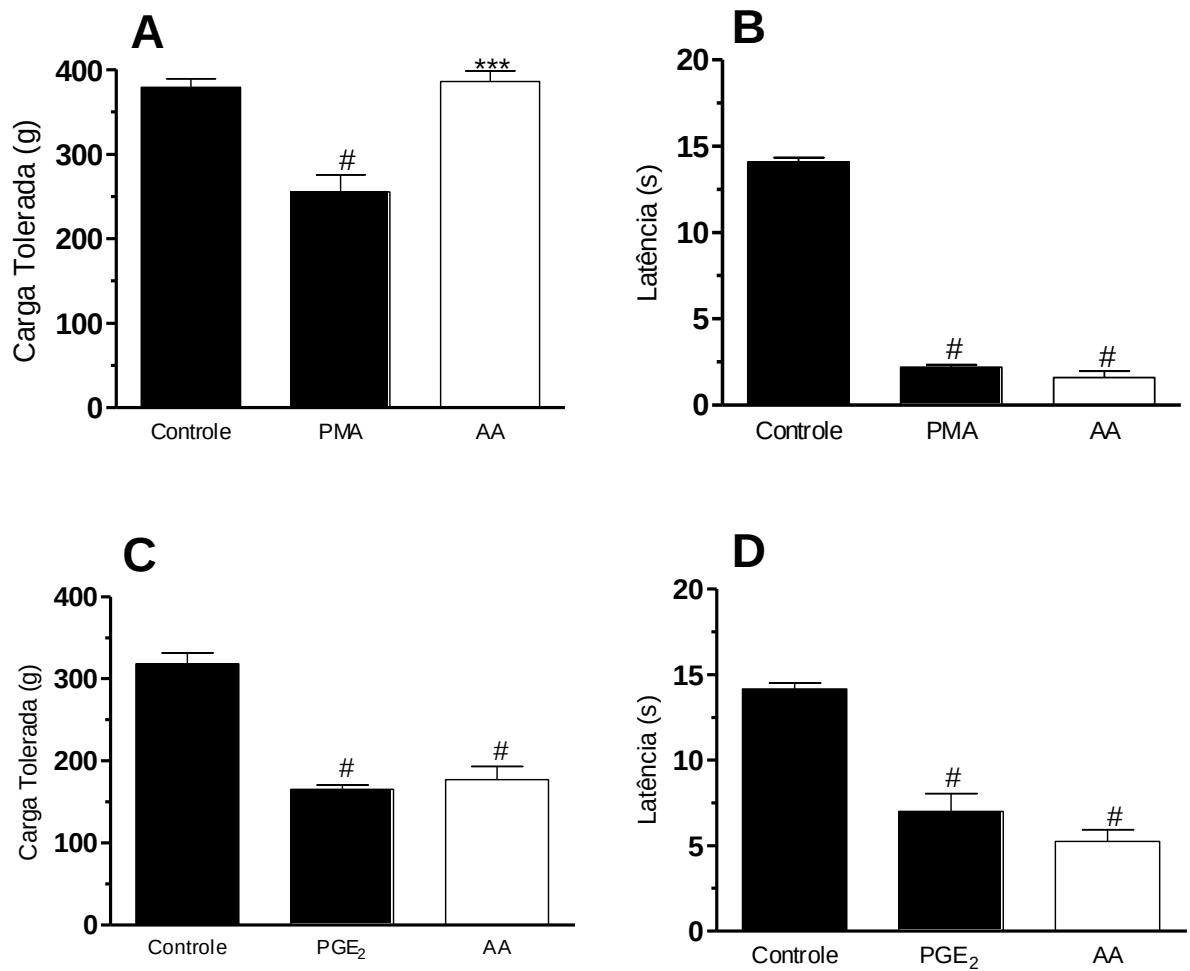


Figura 9: Efeito do AA (3 mg/kg, i.p.) na hiperalgesia mecânica (**A e C**) e térmica (**B e D**) induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ (10 nmol/pata) e PMA (0,1 nmol/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. *P < 0,05 difere significativamente do grupo dos animais tratados com o agonista (PMA e PGE₂) e # P < 0,001 difere significativamente do grupo de animais tratados com controle (salina).

4.1.6 Análise do mecanismo de ação

4.1.6.1 Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato

Os resultados apresentados na figura 10 mostram que o pré-tratamento dos animais com o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (60 µg/pata, i.pl.), reverteu completamente a antinocicepção causada pelo AA (0,1 µg, i.pl.) e pela L-NOARG (10 µg, i.pl.).

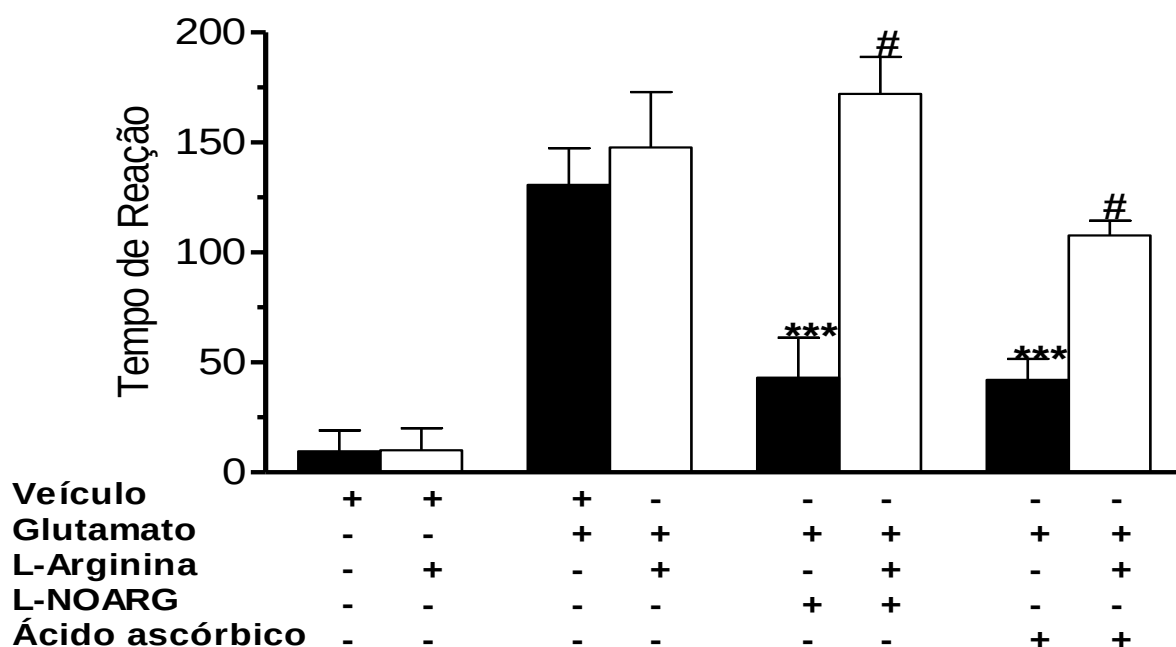


Figura 10. Efeito do pré-tratamento dos animais com a L-arginina (60 µg/pata, i.pl.) na antinocicepção causada pelo AA (0,1 µg, i.pl.) e pelo L-NOARG (10 µg, i.pl.) no modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 µmol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. #P < 0,01 difere significativamente do AA e da L-NOARG, respectivamente e ***P < 0,001 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com o veículo).

4.1.6.2 Influência do mecanismo redox no pré-tratamento com DTT sobre o efeito antinociceptivo do ácido ascórbico no modelo do glutamato

Os resultados apresentados nesta figura 11 mostram que a administração do AA (0,1 µg/pata) e do DTNB (400 ng/pata, agente oxidante), em associação com o glutamato, resultou numa inibição de forma significativa da nocicepção causada pela glutamato. Além disso, os dados também indicam que este efeito antinociceptivo causado pelo AA e pelo DTNB foram completamente revertidos pelo pré-tratamento dos animais com DTT (0,3 µg/pata, agente redutor).

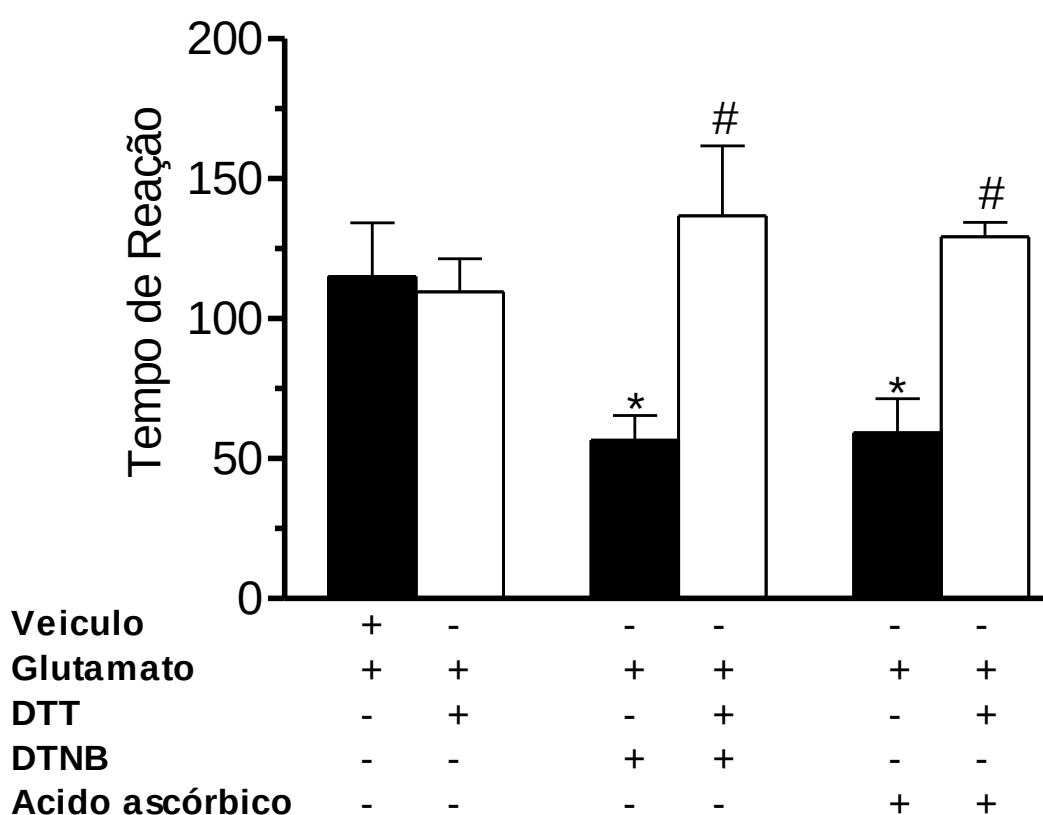


Figura 11. Efeito do pré-tratamento dos animais com DTT (0,3 µg/pata, agente redutor) na antinocicepção causada pelo AA (0,1 µg, i.pl.) e pelo DTNB (400 ng/pata, agente oxidante) no modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. e *P< 0,05 em relação ao grupo controle (animais tratados apenas com o veículo). #P< 0,01 difere significativamente do (AA e DTNB)

4.1.6.3. Influência dos transportadores de ácido ascórbico/glutamato no modelo do glutamato

Os dados apresentados nas Figuras 4 (A e B) e 5 (A e B) indicam que os AA nas maiores doses utilizadas não causaram aumento da atividade antinociceptiva tanto na nocicepção causada pela formalina quanto a induzida pelo glutamato, pelo contrário, nas maiores doses utilizadas tanto via i.p. quanto i.pl., o AA não apresentou atividade antinociceptiva e/ou seu efeito foi menor em relação a menor dose (Figuras 4 e 5, A e B). Desta forma, com o intuito de explicar estes efeitos, os resultados apresentados na figura 12 demonstram que o pré-tratamento dos animais com CSB (100 ng/pata, bloqueador da captação de glutamato) 10 min antes da co-administração do AA (3 µg/pata co-administrado com glutamato) potencializou a resposta nociceptiva do glutamato (0,03 µmol/pata, dose-subativa) e este efeito foi completamente inibido pelo AA, demonstrando a participação deste sistema de captação de glutamato na ação antinociceptiva do AA.

A Figura 13 demonstra que o pré-tratamento dos animais com CSB (100 ng/pata, bloqueador da captação de glutamato) 10 min antes da co-administração do AA (3 µg/pata co-administrado com glutamato) potencializou a resposta nociceptiva do glutamato (10 µmol/pata, dose-ativa) e este efeito também foi completamente inibido pelo AA.

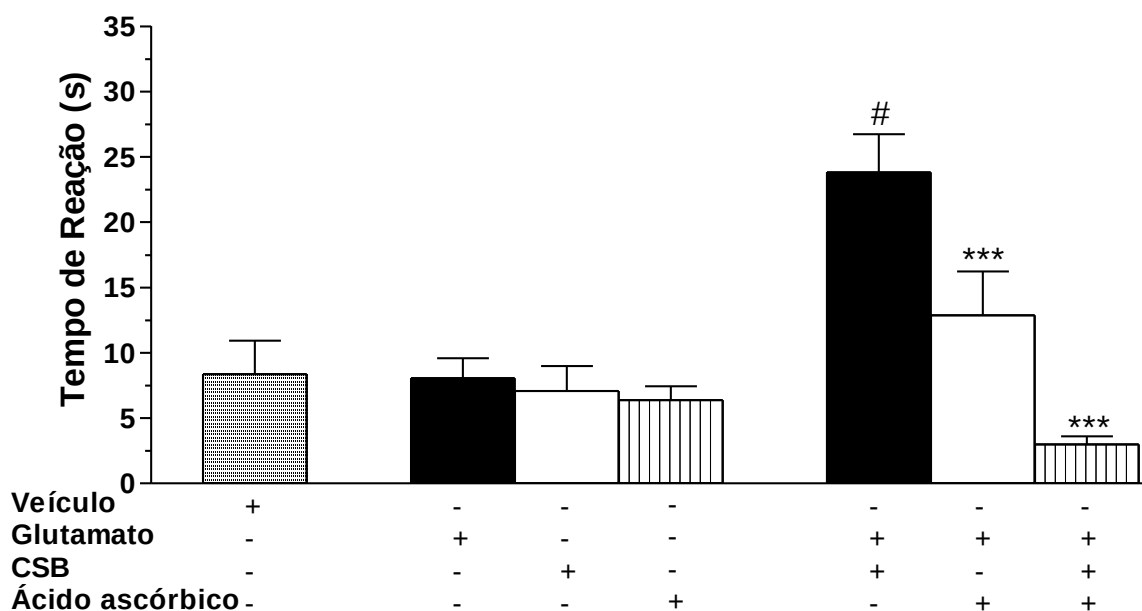


Figura 12. Efeito do pré-tratamento dos animais com CSB (Chicago skay blue) (100 ng/pata,) na antinocicepção causada pelo AA (3 µg/pata)no modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (0,03 µmol/pata, dose-subativa) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. #P < 0,001 difere significativamente do grupo controle tratado com glutamato e ***P < 0,001 difere significativamente do grupo pré-tratado com CSB. #P < 0,001 difere significativamente do grupo controle tratado com glutamato e ****P < 0,001 em relação ao grupo tratado com veículo (salina).

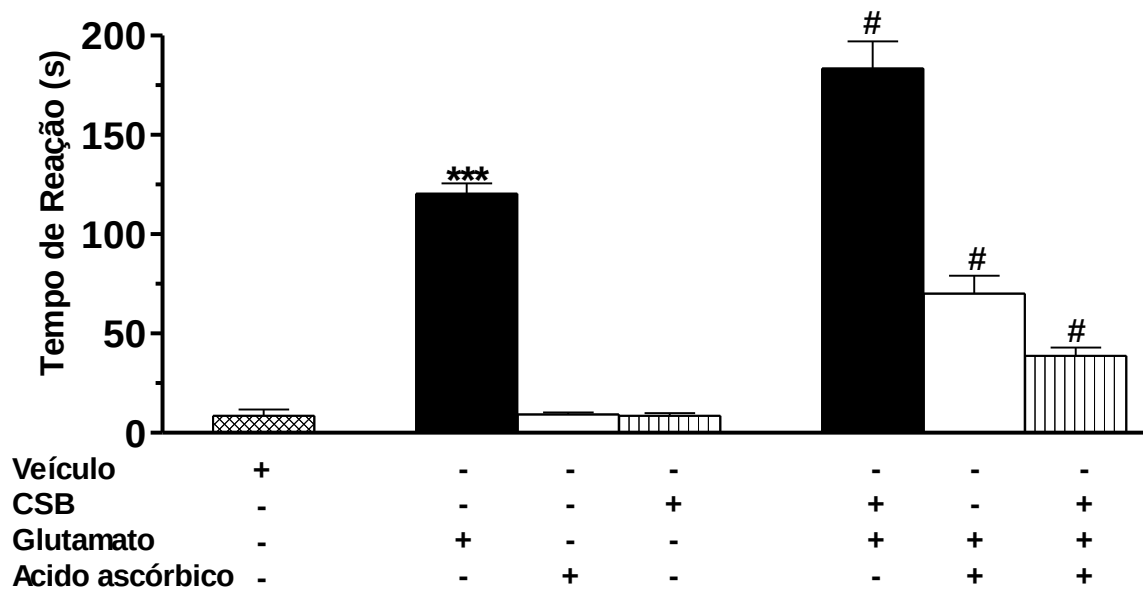


Figura 13. Efeito do pré-tratamento dos animais com CSB (Chicago skay blue) na antinocicepção causada pelo AA no modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 μ mol/pata, dose ativa) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais, e as linhas verticais, indicam os E.P.M. #P < 0,001 difere significativamente do grupo controle tratado com glutamato e ***P < 0,001 difere significativamente do grupo pré-tratado com CSB. #P < 0,001 difere significativamente do grupo controle tratado com glutamato e ***P < 0,001 em relação ao grupo tratado com veículo (salina).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a administração sistêmica de AA foi capaz de produzir efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química e térmica em camundongos e ratos. Os dados mais relevantes deste estudo foram que o AA, administrado sistemicamente (via i.p.), causou significativa inibição tanto da nocicepção neurogênica (resposta fásica), quanto da nocicepção inflamatória (resposta tônica), causada pela injeção i.pl. de formalina. Além disso, o AA inibiu a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina e glutamato. É interessante mencionar que o AA administrado pela via i.p. foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela injeção i.pl. de bradicinina, SP, carragenina e adrenalina, contudo o mesmo tratamento com o AA reverteu somente a hiperalgesia mecânica provocado pelo PMA e foi incapaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela prostaglandinas E_2 . Por outro lado, é importante mencionar que o efeito antinociceptivo do AA na nocicepção induzida pelo glutamato foi dependente, pelo menos em parte, da inibição da via da L-arginina-óxido nítrico e da ativação (oxidação) do sítio redox do receptor NMDA, tendo em vista que o pré-tratamento dos animais com L-arginina e com DTT reverteu a antinocicepção produzida pelo AA, respectivamente.

O AA é um potente agente antioxidante hidrossolúvel com importantes propriedades de oxido-redução, capaz de seqüestrar e neutralizar espécies reativas de oxigênio e assim, diminuir os efeitos adversos destas moléculas, as quais, são responsáveis por causar lesões oxidativas na célula por interagirem com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (NAIDU et al, 2003). Os danos oxidativos podem culminar ou favorecer o desenvolvimento de doenças crônicas incluindo doenças cardiovasculares, cataratas, câncer, doenças neurodegenerativas, dor e inflamação (CARR, FREI, 2001; LEVINE et al., 1986; NAIDU et al., 2003).

Um considerável número de estudos tem sugerido que o AA modula a liberação de neurotransmissores e hormônios, possivelmente atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso, exercendo assim, papel de fundamental importância em vários processos fisiológicos em mamíferos e, além disso, em certas regiões do encéfalo, o AA pode funcionar como um tipo de sinalizador molecular regulando a eficácia pós-sináptica de neurotransmissores conhecidos como a dopamina e o glutamato (ALBIN et al., 1989; CARLSSON, CARLSSON, 1990; DUNNETT, ROBBINS, 1992; FUXE et al., 1979; GERFEN, 1992; GLOWINSKI et al., 1991; GRAYBIEL, RAGSDALE, 1983; GRAYBIEL, 1990; GROVES, 1983; HABER, 1986; NIEOULLON, KERKERIAN-LEGOFF, 1992).

Além das funções já mencionadas, diversas monografias e revisões têm documentado que o AA pode apresentar outras ações fisiológicas, dentre elas a regulação do sistema glutamatérgico, principalmente, por modular a função do receptor NMDA (CHOI, LIPTON, 2000; MAJEWSKA, 1990).

Neste trabalho, demonstrou-se que o AA foi eficaz em inibir tanto a fase neurogênica (primeira fase) quanto à fase inflamatória (segunda fase) da resposta nociceptiva provocada pela administração i.pl. de formalina. A nocicepção de origem neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto a nocicepção de origem inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e mecanismos de sensibilização central na medula espinhal (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). Além disso, tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina produz significativo aumento nos níveis espinhais de mediadores como: aminoácidos excitatórios, taquicinas, PGE₂, óxido nítrico, cininas e outros peptídeos (MALMBERG, YAKSH, 1995; SANTOS, CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1998; TJØLSEN et al., 1992). De fato, a administração sistêmica, espinhal e supraespinhal de antagonistas dos receptores NMDA, inibidores da NOS e AINES são eficazes em inibir a nocicepção induzida pela formalina (CHAPLAN et al., 1997; MALMBERG, YAKSH, 1995; MOORE et al., 1993; SANTOS, CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1998; SAWAMURA et al., 1999; TJØLSEN et al., 1992). Neste contexto, a administração intraplantar de formalina constitui-se em um excelente modelo para a investigação de substâncias potencialmente antinociceptivas. Por outro lado, este modelo não permite concluir o mecanismo pelo qual o AA está causando antinocicepção.

Outro resultado interessante deste trabalho foi à constatação que o AA, administrado i.p., produziu significativo efeito antinociceptivo, de forma dependente da dose, da nocicepção causada pela capsaicina. Vários trabalhos demonstram que a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), substância ativa encontrada em pimentas vermelhas, é uma valiosa ferramenta farmacológica para o estudo de drogas que atuam modulando a transmissão nociceptiva em mamíferos, uma vez que ela ativa neurônios sensoriais primários do tipo C e Aδ (para revisão ver CALIXTO et al., 2005; HOLZER, 1991, JANCÓS, 1992; SZOLCSANYI, 2004). Além disso, tem sido proposto que a nocicepção induzida pela capsaicina é mediada pela ativação de seu receptor específico conhecido como receptor vanilóide (TRPV₁), um canal catiônico não seletivo, ativado por ligante e encontrado em neurônios sensoriais primários (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998, SZALLASI, BLUMBERG, 1993). De fato, a capsaicina promove a liberação de

neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), NO e mediadores inflamatórios na periferia, transmitindo assim, a informação nociceptiva para a medula espinhal (SZALLASI, BLUMBERG, 1993; SAKURADA et al., 1996, 2003; SANTOS, CALIXTO, 1997;).

Outro achado importante deste estudo reside no fato de que a administração sistêmica de AA inibiu significativamente e de forma dependente da dose, a resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. O glutamato e seus receptores compreendem o sistema de neurotransmissão excitatório mais importante do sistema nervoso de mamíferos. Além disso, está bem estabelecido na literatura que o sistema glutamatérgico desempenha um importante papel nos processos nociceptivos tanto em nível central quanto periférico (FUNDYTUS, 2001; OZAWA et al., 1998; MILLAN, 1999). Os receptores de glutamato são divididos em duas classes distintas, os receptores glutamatérgicos “ionotrópicos”, os quais estão acoplados a canais iônicos, podendo ainda ser subdividido em três tipos distintos, conforme sua permeabilidade a íons e ativação por ligantes: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato; e os receptores glutamatérgicos “metabotrópicos”, os quais estão acoplado a proteína G, modulando assim a subsequente formação de segundos mensageiros e mediadores intracelulares (FUNDYTUS, 2001; OZAWA et al., 1998). Além disso, dados da literatura demonstram que substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos, apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos (LUTFY et al., 1997; NEUGEBAUER, 2002; WIECH et al., 2004). Recentemente, Beirith e colaboradores (2002) verificaram que a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato parece envolver sítios de ação periférica, espinhal e supraespinhal, sendo amplamente mediada tanto por receptores NMDA, quanto não-NMDA, bem como, pela liberação de NO ou por substâncias relacionadas ao NO.

Diante dos dados apresentados anteriormente os quais demonstram que o AA administrado sistemicamente, foi capaz de inibir o efeito nociceptivo induzido pelo glutamato e de acordo com os resultados descritos na literatura o glutamato pode induzir dor por atuar tanto periféricamente quanto centralmente (BEIRITH et al, 2002; JANG et al, 2004; URBAN et al, 2003).

No presente estudo buscou-se investigar também o possível efeito do AA em nível periférico através da administração pela via i.pl. de AA em associação com o glutamato. Assim, nossos dados mostram claramente que o AA administrado periféricamente, pela via

i.pl. em associação com o glutamato, foi capaz de abolir o efeito nociceptivo deste aminoácido, sugerindo assim, uma ação periférica deste antioxidante.

Desta forma, os dados analisados até aqui permitem sugerir que o AA possivelmente está exercendo seu efeito antinociceptivo por estar atuando tanto central quanto periféricamente. Em contrapartida, surge a primeira dúvida em relação aos resultados deste estudo, o efeito antinociceptivo produzido pelo AA na nocicepção induzida pelo glutamato foi significativamente reduzido ou abolido quando doses maiores de AA foram administradas, tanto em nível sistêmico (via i.p.) quanto em nível periférico (via i.pl. em associação com o glutamato), sugerindo que o AA pode apresentar diferentes efeitos dependendo da dose utilizada. A partir deste resultado, buscou-se entender porque o AA estaria perdendo seu efeito antinociceptivo quando utilizado em doses elevadas.

De acordo com dados da literatura, a regulação dinâmica das concentrações de ascorbato e glutamato é mediada por um mecanismo de trocadores e/ou transportadores, onde a captação de glutamato libera ascorbato, compreendendo assim um sistema de troca muito importante que contribui para proteção celular (GRÜNEWALD, 1993; GRÜNEWALD, FILLENZ, 1993, MIELE et al., 1994).

De fato, dados da literatura demonstram através de experimentos *in vivo* que a administração de glutamato promove um aumento dependente da dose na concentração de ascorbato extracelular, que foi prevenida por inibidores da captação de glutamato, mas não por antagonistas glutamatérgicos (CAMMACK et al., 1991). Contudo, os dados da literatura suscitam duas importantes questões que precisam ser esclarecidas: 1) quais os transportadores de glutamato que estão envolvidos neste mecanismo? e 2) onde eles estão localizados, nos neurônios ou na glia? Estas questões são importantes, tendo em vista que até o momento cinco tipos de transportadores de glutamato ou de aminoácidos excitatórios foram identificados (GEGELASHVILI, SCHOUSBOE, 1994; TROTTI et al., 1998).

Destes, os EAAT1 também conhecidos como GLAST encontra-se em grandes níveis no encéfalo, os EAAT2 conhecidos como GLT1 que são predominantemente encontrados em células gliais, os EAAT3 também conhecidos como EAAC1 encontrados em neurônios e células glutamatérgicas e não-glutamatérgicas e os EAAT4 que são encontrados em grandes níveis nas células cerebelares e de purkinje e recentemente tem sido descrito o EAAT5 que é encontrado na retina (CHAUDHRY et al., 1995; GEGELASHVILI, SCHOUSBOE, 1994; TORP et al., 1998). Contudo a determinação de quais os transportadores e que tipo de células são envolvidas neste mecanismo de trocadores de ascorbato-glutamato, tem sido bastante limitada, devido à falta de inibidores específicos do transporte de glutamato (CAMMACK et

al., 1991).

A hipótese levantada para explicar estes resultados foi baseada nos estudos de Miele e colaboradores (1994); Grunewald (1993) que determinaram a existência deste mecanismo de captação de glutamato e liberação de ascorbato. A explicação seria da seguinte forma, à medida que se aumenta a concentração de AA, estes trocadores citados por eles poderiam estar assumindo uma função contrária a normal, ou seja, um papel inverso, ao invés de captarem o glutamato administrado a fim de proteger a integridade celular, eles estariam captando o AA que estaria em altas concentrações e deixando o glutamato no meio extracelular, e este por sua vez estaria ativando as fibras aferentes primárias nociceptivas, explicando em parte a redução do efeito antinociceptivo produzido pelo AA em doses maiores.

Assim, para poder confirmar esta hipótese, optou-se em investigar a ação do AA em nível periférico em associação com o glutamato, a fim de se obter resultados mais precisos e que nos ajudariam a entender melhor o porquê das reduções do efeito antinociceptivo em maiores doses do AA na nocicepção induzida tanto pelo glutamato quanto pela formalina.

De fato, os dados do presente estudo demonstram que o AA em altas concentrações (doses) compete com o glutamato pelo transportador o que resulta no aumento da concentração de glutamato na pata e posteriormente uma excitação dos neurônios sensoriais causando aumento da resposta nociceptiva. Tal evidência foi confirmada pelo uso do Chicago Sky Blue (CBS), um inibidor da captação de glutamato, o qual potencializou a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato, tanto administrado em dose subativa quanto em dose ativa, em todos os animais estudados. Além disso, o CBS também restabeleceu o efeito antinociceptivo causado pelo AA, ou seja, os animais que receberam CBS e AA (em doses altas) apresentaram redução da resposta sensorial diferentemente dos animais que não receberam CBS na nocicepção induzida pelo glutamato. Diante disso, estes resultados fornecem evidências claras da participação dos transportadores de glutamato, a nível periférico e/ou central, no controle do estímulo nociceptivo, bem como o envolvimento do AA neste sistema de transporte, provavelmente, competindo com o glutamato pelo transportador (RICE, 2000).

Outro resultado importante deste trabalho foi que além de apresentar efeito antinociceptivo periférico, o AA também apresentou efeito antinociceptivo em nível central, reduzindo a resposta nociceptiva produzida pela administração intratecal de glutamato, o que confirma os experimentos anteriores e mostra que a atividade antinociceptiva do AA ocorre também em nível central.

Neste sentido, o AA administrado pela via i.p. também foi capaz de inibir de forma significativa a nocicepção causada pela injeção intratecal de NMDA, demonstrando o envolvimento dos receptores NMDA em nível espinhal em sua ação antinociceptiva. O AA também foi capaz de inibir de forma significativa a nocicepção causada pela injeção intratecal de cainato e AMPA, contudo o AA não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo agonista glutamatérgico do tipo metabotrópico trans-ACPD. Assim, estes resultados nos fornecem evidências claras do envolvimento do sistema glutamatérgico, principalmente dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, no efeito antinociceptivo do AA tanto em nível periférico quanto central.

É importante mencionar que no presente estudo foi demonstrado que o AA administrado pela via i.p. também foi eficaz em reverter a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de substância P. De fato, a substância P é um dos principais neuropeptídeos envolvidos na transmissão e manutenção da nocicepção tanto periférica quanto central. Além disso, vários estudos demonstram uma interação da substância P com o glutamato em nível espinhal (AFRAH et al., 2001; NAKATSUKA et al., 2005; OHTORI et al., 2002).

Neste sentido, o comportamento de nocicepção observado pela administração intratecal de substância P é potencializado pela co-administração de NMDA. Além disso, tem sido demonstrado que receptores NMDA pré-sinápticos, localizados nos terminais de fibras de pequeno diâmetro, facilitam e prolongam a resposta nociceptiva através da liberação de SP e glutamato (LIU et al., 1997; MJELLEM-JOLY et al., 1992). Assim, alguns autores demonstram uma interação do sistema glutamatérgico em nível espinhal na nocicepção induzida por SP cuja ativação de terminais nociceptivos também promove produção de NO (CARUSO et al., 2006; SAKURADA et al., 1996).

De fato, os dados da literatura mostram que inibidores da síntese de NO e antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos tanto NMDA quanto não-NMDA são eficazes em inibir a resposta nociceptiva causada pela capsaicina, formalina e glutamato em roedores (DAVIDSON et al., 1997; DOURSOUT et al., 2003; LARSON et al., 2000;). Considerando estes dados, o presente estudo procurou analisar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva do AA.

Os resultados do presente estudo mostram que o efeito antinociceptivo do AA realmente parece estar pelo menos em parte, relacionado com a via da L-arginina-óxido nítrico. Esta afirmação deriva do fato de que a administração prévia, i.pl., do aminoácido L-arginina (precursor de NO) em uma dose na qual não produziu nenhum efeito *per se* no modelo do glutamato, reverteu significativamente a antinocicepção causada pelo inibidor da

sintase do NO, L-NOARG, e também foi capaz de reverter significativamente a atividade antinociceptiva do AA em relação a nocicepção induzida pelo glutamato.

Dentre as desordens que comumente ocorrem com pacientes que apresentam dor estão os quadros de hipersensibilidade, dentre os quais a hiperalgesia (resposta aumentada para estímulos nocivos) e a alodinia (resposta aumentada para estímulos não nocivos) (MILLAN, 1999). A hiperalgesia é um estado da dor, caracterizado pela redução do limiar nociceptivo e esta associada à resposta nociceptiva em vários modelos de nocicepção (térmica, química e mecânica), influenciada por mediadores inflamatórios tornando as fibras sensoriais nociceptivas mais sensíveis (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Assim, neste trabalho procurou-se investigar o possível efeito do AA na hiperalgesia causada por vários mediadores pró-inflamatórios que participam da gênese da nocicepção induzida por glutamato, formalina e capsaicina. Diante disso, buscou-se analisar a capacidade do AA em reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela administração pela via i.pl. de SP, PMA, PGE₂, carragenina, adrenalina e bradicinina administrados em ratos.

Os dados da literatura têm demonstrado que vários mediadores pró-inflamatórios produzem hipernocicepção por sensibilizar fibras sensoriais espinhais e periféricas através da atuação de proteínas quinases, incluindo PKC, PKA e quinases ativadas por mitógenos (SCHOLZ, WOOLF, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que em nociceptores, a bradicinina se liga em receptores B₂, causando a ativação direta de PKC e indireta de PKA. É importante mencionar que dados recente têm proposto que a nocicepção induzida pela SP também é mediada pela ativação periférica de PKC e, ainda pelos receptores vanilóides (FERREIRA et al. 2004, 2005).

No entanto, a hipernocicepção produzida pela carragenina, parece ser dependente, pelo menos em parte, da síntese dos produtos dependente da via das ciclooxigenases, que atuando sob o ácido araquidônico, resulta no aumento na síntese de prostaglandinas e também de outros mediadores que estão presentes no quadro inflamatório (DE CAMPOS et al., 1996). Assim dados da literatura demonstram que a prostaglandina E₂ é capaz de induzir uma resposta hipernociceptiva por modular a corrente de canais iônicos dependentes em terminais nociceptivos e também ativar diretamente o PKA (KHASAR et al., 1999; PORTANOVA et al., 1996; TREBINO et al., 2003). Já o PMA exerce seus efeitos por ativar diretamente PKC bem a como a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios e conseqüentemente contribuindo para o aumento da resposta inflamatória (FERREIRA et al., 2005; SZALLASI, BLUMBERG, 1999; TSUCHIYA et al., 2005). Desta forma, estes resultados podem sugerir que o AA pode inibir a hiperalgesia induzida por diferentes agentes por atuar inibindo

preferencialmente a PKC. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Finalmente, vem se demonstrando que o AA exerce parte de seus efeitos biológicos por atuar em NMDA modulando o sítio redox presente neste receptor. Este sítio possui a capacidade de alterar a conformação e modular as funções do receptor NMDA (CHOI, LIPTON, 2000).

De fato, Aizenman e colaboradores (1989) demonstraram que a atividade do receptor NMDA pode ser modulada por redutores e oxidantes de grupos sulfidríla demonstrando que agentes redutores como o DTT tem a capacidade de potencializar a corrente induzida por NMDA, enquanto o agente oxidante DTNB diminui esta corrente em cultura de células cerebrocorticais e gânglios da retina. (AIZENMAN et al, 1989). Estas observações de que ambos agentes, redutores e oxidantes, têm efeito sobre a corrente produzida pelo NMDA, confirma a existência de um sítio regulatório redox neste receptor, o qual, no estado basal, encontra-se em equilíbrio entre o estado oxidado e reduzido. Desta forma, podemos afirmar que de acordo com a literatura, os nossos resultados fornecem evidências claras da participação deste mecanismo no efeito antinociceptivo do AA (CHOI, LIPTON, 2000). Esta afirmação deriva do fato que o pré-tratamento dos animais pela via i.pl. com o agente redutor DTT reverte o efeito antinociceptivo do agente oxidante DTNB e da mesma forma do antioxidante AA na nocicepção induzida pelo glutamato, demonstrando que a ação antinociceptiva do AA está diretamente relacionada com a modulação redox do receptor NMDA.

Em conclusão, os resultados do presente estudo fornecem evidências claras de que o AA exerce importante efeito antinociceptivo contra a nocicepção induzida pela formalina, capsaicina, glutamato, cainato, NMDA, AMPA e SP. Ele também é eficaz em reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por diferentes agentes flogísticos, entre eles os mediadores pró-inflamatórios (SP e bradicinina) e irritantes (carragenina e adrenalina). Além disso, o AA foi eficaz em reverter apenas a hiperalgesia mecânica induzida pelo PMA, e não foi capaz em reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela prostaglandina E₂. Os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da AA não estão completamente elucidados, mas os nossos dados sugerem, pelo menos em parte, que o AA pode atuar: (1) modulando a atividade do receptor NMDA, provavelmente no sítio redox do receptor; (2) inibindo a via da L-arginina-óxido nítrico; (3) inibindo a ação ou liberação de mediadores pró-inflamatórios; (4) alterando o transporte de glutamato e inibindo a ativação de proteínas quinases importantes na transmissão nociceptiva em especial a PKC.

12. REFERÊNCIAS

AFRAH, A.W., et al. Involvement of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in capsaicin-induced in vivo release of substance P in the rat dorsal horn. **Neuroscience Letters**. v.316, n.2, p.83-86. 2001.

ALBIN, R.L.; YOUNG, A.B.; PENNY, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciences**. v.12, n.10, p. 366-375. 1989.

AIZENMAN, E.; LIPTON, S.A.; LORING, R.H. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. **Neuron**. v.2, n.3, p.1257-1263.1989.

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 Research**. v.924, n.2, p. 219-228. 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**. v.969, n.1 , p.110-116. 2003.

BESSON, J.M.; CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**. v.67, n.1, p. 67-186. 1987.

BESSON J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. v.53, n.1, p.1-9. 1997.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v.353, n.9164, p. 1610-1615. 1999.

BORIS, A., et al. The N-methyl-D-aspartate antagonistic and opioid components of d-methadone antinociception in the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**. v.296, n.2, p.117-120. 2000.

BRIGGS, M.H.; GARCIA-WEBB P.; DAVIES P. Urinary oxalate and vitamin C supplements. **The Lancet**. v.2, n.7822, p.201. 1973.

BUETTNER, G.R.; MOSELEY, P.L. EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. **Free Radical Research Communications**.v.19, n.1, p.89-93. 1993.

CALIXTO, J.B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology and Therapeutics**. v.106, n.2, p.179-208. 2005.

CAMMACK, J.; GHASEMZADEH, B.; ADAMS, R.N. The Pharmacological profile of glutamate-evoked ascorbic acid efflux measured by in vivo electrochemistry. **Brain Research**. v.565, n.1, p. 17-22. 1991.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**. v.13, n.7 , p.272-276. 1990.

CARR, A.C.; FREI, B. Does vitamin C as pro-oxidant under physiological conditions? **The FASEB Journal**. v.13, n.9, p.1007 -1024. 2001.

CARUSO, C., et al. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. **Neuroscience Letters**. v. 393, n.1, p. 60-64. 2006.

CATERINA, M.J., et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v.389, n.6653, p.816-824. 1997.

CHAPLAN, S.R.; MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.280, n.2, p.829-838. 1997.

CHAUDHRY, F.A., et al. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron**. v.15, n.3 , p.711-720.1995.

CHOI, Y.B.; LIPTON, S.A. Redox modulation of the NMDA receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.57, n.11, p.1535-1541. 2000.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Reviews**. v.24, n.1, p.28-66. 1997.

COHEN, M.V. 1989. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**. v.111, n.11, p.918-931.

COYLE, J.T.; PUTTFAECKEN. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**. v.262, n.5134, p.689-695.1993.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Londres: Churchill Livingstone. p.1-8. 1999.

DAVIDSON, E.M.; COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport**. v.8, n.4, p.941-946. 1997.

DE CAMPOS, R.O., et al. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**. v.316, n.2, p. 277-286 .1996.

DOURSOUT, M.F.; LIANG, Y.; CHELLY, J.E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Canadian Journal of Anaesthesia**. v.50, n.9, p. 909-916. 2003.

DICKENSON, A.H. Plasticity: implications for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. **The Behavioral and Brain Sciences**. v.20, n.3, p.392-403. 1997.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.15, n.6, p.190-197. 1994.

DRAY, A. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson A, Besson J, editors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/I., Berlin: Springer. p.21-41. 1997.

DUNNETT, S.B.; ROBBINS, T.W. The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v.67, n.4, p.491-518. 1992.

EISENBERG, E.; VOS, B.P; STRASSMAN, A.M. The NMDA antagonist memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. **Pain**. v.54, n.3, p.302-307. 1993.

FERREIRA, J.; SILVA, G. L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**. v.141, n.5 , p.787-794.2004.

FERREIRA, J. et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Pain**. v.117, n.1, p.171-181. 2005.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **The FASEB Journal**. v.4, n.9, p.2587-2597. 1990.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CSN Drugs**. v.15, n.1, p. 29-58. 2001.

FUXE, K., et al. Studies on different types of dopamine nerve terminals in the forebrain and their possible interactions with neurons containing GABA, glutamate, and opioid peptides and with hormones. In: **The Extrapyramidal System and Its Disorders**. p. 19-216. Eds: Poirier L. J., Sourkes T. L., Bedard P. J.. Raven Press: New York. Arch. Neurol. 43, 1058-1063. 1979.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. **Brain Research Bulletin**. v.45, n.3, p.233-238. 1994.

GERFEN, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Annual Review of Neuroscience**. v.15, n.1, p. 285-320. 1992.

GLOWINSKI J.; BARBIETO, L.; CHERAMY, A. Influence of cortico-striatal glutamatergic neurons on dopaminergic transmission in the striatum. In: **The Basal Ganglia II**. p.347-356. 1991.

GOZLAN, H.; BEN-ARI, Y. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? **Trends in Pharmacology Sciences**. v.16, n.11, p.368-374.1995.

GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE Jr C.W. Biochemical anatomy of the striatum. In: **Chemical Neuroanatomy**. p.427-504. Ed.: Emson P. C. New York: Raven Press. 1983.

GRAYBIEL, A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. **Trends in Neuroscience**. v.13, n.1, p.244-254. 1990.

GROVES, P.M. A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. **Brain Research Reviews**. v.5, n. , p.109-132. 1983.

GRÜNEWALD, R.A. Ascorbic acid in the brain. **Brain Research Reviews**. v.18, n.2, p.123-133. 1993.

GRÜNEWALD, R.A.; FILLENZ, M. Release of ascorbate from a synaptosomal fraction of rat brain. **Neurochemical International**. v.6, n.1, p.491-500.1984.

GUIRIMAND, F.; LE BARS, D. Physiologie de la nociception. **Annales françaises d'anesthésie et de réanimation**. v.15, n.1, p. 1048-1079. 1996.

GUYTON, A.C. Sensações Somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.458-467. 1992.

HABER, S.N. Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglion. **Human Neurobiology**. v. 5, n.1, p.159-168. 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzimology**. v.186, n.1, p.1-85. 1990.

HARGREAVES, K., et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgesia. **Pain**. v.32, n.1, p. 77- 88. 1998.

HAWORTH, W.N.; HIRST, E.L. Synthesis of ascorbic acid. **Journal of the Society Chemical Industry (London)**. v.52, n.1, p.645-647. 1932.

HILL, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **The Neuroscientist**. v.7, n.4, p.282-292. 2001.

HOLZER, P. Capsaicin as tool for studying sensory neuron function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 298, n.1, p. 3-16. 1991.

HUGHES, R.E.; HURLEY, R.J.; JONES, P.R. The retention of ascorbic acid by guinea pig tissues. **The British Journal of Nutrition**. v.26, n.3, p.433-438. 1971.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v.30, n.1, p.103-114. 1987.

HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**. v.67, n.2 , p.313-316. 1980.

JANCSÓ, G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. **Experimental Physiology**. v.77, n.3, p.405-431. 1992.

JANG, J.H., et al. Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat. **Neuroscience**. v.128, n.1, p.196- 176. 2004.

JANSSEN, A.M., et al. SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. **British Journal of Cancer**. v.78, n.1, p.1051-1057. 1998.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v.413, n.6852, p.203-210. 2001.

KHASAR, S.G., et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase epsilon mutant mice. **Neuron**. v.24, n.1, p.253-260.1999.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Manole. 2001.

KORZENIEWSKA-RYBICKA I.; PLAZNIK, A. Analgesic effect of antidepressant drugs. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.59, n.1, p.331-338. 1998.

LAM, D.K.C.; DANIEL, P.M. The influx of ascorbic acid into the rat's brain. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**. v.71, n.3, p.483-489. 1986.

LARSON, A.A., et al. Zinc in the extracellular area of the central nervous system is necessary for the development of kainic acid-induced persistent hyperalgesia in mice. **Pain**. v.86, n.1, p.177-184. 2000.

LAUGHLIN, S.B.; STEVENINCK, R.R.R.; ANDERSON, J.C. The metabolic cost of neural information. **Nature Neuroscience**. v.1, n.1, p.36-41. 1998.

LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of Pain**. 3.ed. Churchill Livingstone. p. 45-56. 1994.

LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. **The New England Journal of Medicine**. v.314, n.14, p.892-901. 1986.

LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.L. NMDA receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**. v.386, n. , p.721-724. 1997.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**. v.353, n.1, p.1607-1609. 1999.

LUTFY, K., et al. 1997. Antinociceptive effects of NMDA and non- NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**. v.70, n.1, p.31-40.

MAJEWSKA, M.D.; BELL, J.A.; LONDON, E.D. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Research**. v.537, n.1, p.328-332. 1990.

MACFARLANE, B.V., et al. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology and Therapeutics**. v.75, n.1, p.1-19, 1997.

MALMBERG, A.B.; YASH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**.v.114, n.5, p.1069-1075. 1995.

MELOV, S., et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**. v.18, n.2, p.159-163. 1998.

MENDES, G.L., et al. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.292, n.1, p.164-172. 2000.

MIELE, M.; BOUTELLE, M.G.; FILLENZ, M. The physiologically induced release of ascorbate in rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. **Neuroscience**. v.62, n.1, p.87-91. 1994.

MJELLEM-JOLY, N., et al. Intrathecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. **Pain**. v.51, n.2, p.195-198. 1992.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v.57, n.1, p.1-164. 1999.

MILLAN, M.J. 2002. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v.66, n.6, p.355-474.

MOORE, P.K., et al. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **British Journal of Pharmacology**. v.110, n.1, p.219-224. 1993.

NAKATSUKA, T., et al. Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord. **Molecular Pain**. v.29, n.1, p.1-20. 2005.

NAIDU, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutrition Journal**. v.21, n.1, p.2:7. 2003. 2003.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors—important modulators of nociception and pain behavioral. **Pain**. v.98, n.1, p.1-8. 2002.

NIEOULLON, A.; KERKERIAN-LEGOFF, L. Cellular interactions in the striatum involving neuronal systems using "classical" neurotransmitters: possible functional implications. **Movement Disorders**. v.7, n.4, p.311-325.1992.

OHTORI, S. et al. Up-regulation of substance P and NMDA receptor mRNA in dorsal horn and preganglionic sympathetic neurons during adjuvant-induced noxious stimulation in rats. **Annals of Anatomy**. v.184, n.1, p.71-76. 2002.

OTUKI, M.F., et al. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.313, n.1, p.310-318.2005.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**. v.54, n.1, p.581-618. 1998.

PADAYATTY, J.S. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. **Journal of the American College of Nutrition**. v.22, n.1, p.18-35. 2003.

PARKES, T.L., et al. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. **Nature Genetics**. v.19, n.2, p.171-174. 1998.

PORTANOVA, J.P., et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**. v.184, n.3, p.883-891. 1996.

PRATICÓ, D.; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**. v.109, n.7, p.577-585. 2000.

RAJA, S.N., et al. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D., Melzack R. **Textbook of pain**. Londres: Churchill Livingstone. p.1-8. 1999.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**. v.111, n.4, p. 409-419. 1957.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall, P.D., Melzack, R. **Textbook of Pain**. 3.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 57-78. 1994.

REBEC, G.V.; PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Progress in Neurobiology**. v.43, n.6, p.537-565.1994.

RICE, M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in Neurosciences**. v.23, n.5, p.209-216. 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**. v.60, n.6, p.404-415. 2001.

ROSA, K.A., et al. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**. v.381, n.1, p.185-188. 2005.

RUSSO, C.M.; BRODE, W.G. Chronic pain. **Annual review of medicine**. v.49, n.1, p.123-133. 1998.

SAKURADA, T., et al. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavioral**. v.75, n.1, p.115-121. 2003.

SAKURADA, T. el. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**. v.29, n.3, p. 271-278. 1996.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinins receptor subtypes on formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v.31, n.4, p. 381-389. 1997.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; DE FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**. v.47, n.7, p.302-307. 1998.

SANTOS, A.R.S., et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.289, n.1, p. 417-426. 1999.

SAWAMURA, S., et al. Opioidergic and adrenergic modulation of formalin-evoked spinal c-fos mRNA expression and nocifensive behavior in the rat. **European Journal of Pharmacology**. v.379, n.2, p.141-149. 1999.

SCHEIDT, C., et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by sesquiterpene drimanial. **Neuropharmacology**. v.43, n.3, p.340 - 347. 2002.

SCHOLZ, J.; WOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. v.5, n.1, p.1062-1067. 2002.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **European Journal of Pharmacology**. v.375, n.1, p.31-40. 1999.

SPECTOR, R. Vitamin homeostasis in the central nervous system. **The New England Journal of Medicine**. v.296, n.24, p.1393-1398. 1977.

SPECTOR, R.; LORENZO, A.V. Specificity of ascorbic acid transport system of the central nervous system. **The American Journal of Physiology**. v.226, n.6, p.1468-1473. 1973.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Mechanism and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Advances in pharmacology**. v.24, n.1, p.123-155. 1993.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacology Reviews**. v.51, n.1, p.159-212. 1999.

SZOLCSANYI, J. J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**. v.38, n.6, p.377-84. 2004.

TJØLSEN, A., et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v.51, n.1, p.5-17. 1992.

TOMINAGA, M., et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. **Neuron**. v.21, n.1, p.531- 543. 1998.

TORP, R., et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. **The European Journal of Neuroscience**. v.6, n.6, p.936-42. 1998.

TREBINO, C.E., et al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v.100, n.15, p. 9044-9049. 2003.

TROTTI, D.; DANBOLT, N.C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**. v.19, n.8, p.328-334.1998.

TSUCHIYA, M.; SAKAKIBARA, A.; YAMAMOTO, M.A. Tachykinin NK1 receptor antagonist attenuates the 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. **European Journal of Pharmacology**. v.507, n.1, p.29-34. 2005.

URBAN, M.O., et al. Role of metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) in the maintenance of cold hypersensitivity following a peripheral mononeuropathy in the rat. **Neuropharmacology**. v.44, n.8, p.983-93. 2003.

WIECH, K. et al. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesthesia and Analgesia**. v.98, n.2, p.408-413. 2004.

WOOD, J.N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Annual Review of Physiology**. v.59, n.1, p.457-482. 1997.

WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**. v.47, n.1, p.1-9. 1994.

YONEHARA, N.; KUDO, C.; KAMISAKI, Y. Involvement of NMDA–nitric oxide pathways in the development of tactile hypersensitivity evoked by the loose-ligation of inferior alveolar nerves in rats. **Brain research**. v.963, n.1, p. 232-243. 2003.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in treatment of pain. **CNS Drugs**. v.15, n.1, p.29-58. 1983.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)