

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

KAREN OLIVIA BAZZO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRANS-RESVERATROL SOBRE A NOCICEPÇÃO
ESPONTÂNEA INDUZIDA PELA CAPSAICINA E GLUTAMATO EM
CAMUNDONGOS**

PORTO ALEGRE

2011

KAREN OLIVIA BAZZO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRANS-RESVERATROL SOBRE A NOCICEPÇÃO
ESPONTÂNEA INDUZIDA PELA CAPSAICINA E GLUTAMATO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde, Área de Concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Hubner de Souza

Porto Alegre

2011

KAREN OLIVIA BAZZO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO TRANS-RESVERATROL SOBRE A NOCICEPÇÃO
ESPONTÂNEA INDUZIDA PELA CAPSAICINA E GLUTAMATO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde, Área de Concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Examinador 1

Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Examinador 2

Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Examinador 3

Dra. Fernanda Bueno Morrone

Examinador 4

Dr. Rafael Fernandes Zanin

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B364a Bazzo, Karen Olivia

Análise dos efeitos do trans-resveratrol sobre a nociceção espontânea induzida pela capsaicina e glutamato em camundongos / Karen Olivia Bazzo. - Porto Alegre, RS, 2011.

61 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, 2011.

“Orientação: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos .”

“Co-orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Hubner de Souza.”

Apresenta bibliografia.

1. Farmacologia – Aplicação experimental. 2. Trans-resveratrol

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|--|----------------|
| 1. Farmacologia – Aplicação experimental | 615.038 |
| 2. Trans-resveratrol - Camundongos | 615.03:599.323 |
| 3. Nociceção | 616.8-009.7 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Michele Marques Baptista – CRB 10/1633

*Agradeço a todas as pessoas que tornaram
esse trabalho possível, especialmente
à minha família, meu namorado e
minha orientadora Maria Martha.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Martha Campos, amiga e orientadora, que me recebeu abertamente desde o primeiro instante, agradeço por acreditar em meu potencial e capacidade de tornar este projeto uma realidade e pela compreensão acima de tudo. Agradeço por todo suporte e atenção dedicados ao longo do tempo.

À Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Hubner de Souza, por colaborar de forma tão expressiva e significativa ao trabalho, pelo incentivo, apoio e ensinamentos.

Aos colegas Fernanda, Geferson e Tatiana pela amizade e carinho, e por tornarem todos os momentos agradáveis com sua companhia.

À equipe do laboratório de Farmacologia Aplicada, pela recepção, disponibilidade e compreensão. À Juliano Soares, pelo profissionalismo e excelente assistência.

Às amigas Juliana Comerlato, Francine Bonatto e Fernanda Machado pelo apoio e amizade.

Ao meu namorado Douglas, pelo apoio incondicional e pela compreensão dedicada.

E principalmente, à minha família, que sempre me incentivou de todas as formas, que sempre acreditou na minha capacidade e que sempre torceu pelo meu sucesso. Muito obrigada a tudo e a todos.

RESUMO

O resveratrol (RSV) é um polifenol natural com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes bem descritos. Efeitos significantes sobre a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina em ratos já foram demonstrados. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da administração de RSV em dois modelos de nocicepção espontânea, induzida por capsaicina e glutamato em camundongos, com abordagens para definição dos possíveis mecanismos de ação deste composto. A administração oral de RSV (100 mg/kg) reduziu significativamente o efeito comportamental provocado pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata) ou glutamato (10 µmol/pata). A co-administração de RSV intraplantar (25 µg/sítio) preveniu a nocicepção aguda induzida por glutamato, sem afetar o comportamento induzido pela capsaicina. Em contraste, a injeção intratecal de RSV (300 e 600 µg/sítio) reduziu a nocicepção causada pela capsaicina, mas não pelo glutamato. A administração intracerebroventricular de RSV (300 µg/sítio) inibiu parcialmente a nocicepção induzida pela capsaicina, enquanto que a resposta induzida pelo glutamato permaneceu inalterada. A co-administração de RSV (300 µg/sítio) foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato (30 µg/site), não alterando o comportamento induzido pela capsaicina (6,4 µg/sítio). O tratamento oral com RSV (100 mg/kg) resultou em uma inibição significativa da imunopositividade de c-Fos e de COX-2 na medula espinhal, causada pela capsaicina, bem como, a expressão da COX-2 no córtex. Em relação ao modelo de glutamato, a administração oral de RSV não afetou a expressão c-Fos ou COX-2 na medula espinhal ou córtex. Nossos dados fornecem novas evidências demonstrando que os efeitos analgésicos do RSV são provavelmente mediados por diferentes mecanismos de ação e sítios anatômicos, dependendo do estímulo algogênico.

Abstract

Resveratrol (RSV) is a polyphenol with well-characterized anti-inflammatory and antioxidant actions, with some evidence for antinociceptive effects. Herein, we have evaluated the effects of RSV in two acute mouse models of spontaneous nociception, induced by capsaicin and glutamate, with some attempts to define the possible mechanisms of action of this compound. The oral administration of RSV (100 mg/kg) significantly reduced the licking behavior elicited by the intraplantar injection of capsaicin (1.6 $\mu\text{g}/\text{paw}$) or glutamate (10 $\mu\text{mol}/\text{paw}$). The co-administration of RSV, into the mouse paw (25 $\mu\text{g}/\text{site}$), markedly prevented glutamate-induced licking, without affecting capsaicin-elicited responses. Otherwise, the i.t. injection of RSV (300 and 600 $\mu\text{g}/\text{site}$) widely reduced the licking behavior caused by capsaicin, but not by glutamate. Lastly, the i.c.v. injection of RSV (300 $\mu\text{g}/\text{site}$) caused only a mild inhibition of capsaicin-induced nociception, whereas glutamate responses remained unaffected. Unexpectedly, the co-administration of RSV (300 $\mu\text{g}/\text{site}$) was able to inhibit the biting behavior induced by i.t. injection of glutamate (30 $\mu\text{g}/\text{site}$), leaving capsaicin (6.4 $\mu\text{g}/\text{site}$)-induced biting unaltered. Of note, the oral treatment with RSV (100 mg/kg) resulted in a significant inhibition of capsaicin-induced increase of both c-Fos and COX-2 immunolabeling in the lumbar spinal cord, as well as the COX-2 expression in cortex. In glutamate model, the oral administration of RSV failed to affect either c-Fos or COX-2 activation in spinal or brain tissues. Data provides new evidence showing that analgesic effects of RSV are mediated by different mechanisms of action and anatomical sites, depending on the algogenic stimulus.

ABREVIACOES

RSV – Resveratrol

CAP – Capsaicina

GLU – Glutamato

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.t. – intrathecal

i.pl. – intraplantar

p.o. – via oral

NMDA – N-metil D-Aspartato

TRPV – Receptor Vanilide

TRPV1 – Receptor Vanilide do tipo 1

NO- xido nítrico

ATP- Adenosina trifosfato

GMP-PKG- Guanina monofosfato - protein quinase G

CNS – Central Nervous Sistem

COX-2 – Ciclooxygenase 2

NOS – xido nítrico sintase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. ARTIGO.....	21
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
5. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Dor e Nocicepção

A dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos” (Cheng et al., 2003). A nocicepção compreende toda a transmissão e processamento da informação dolorosa. A dor é um sistema complexo que está vinculado ao aspecto comportamental, pois o processamento da informação não ocorre apenas no sistema somatossensorial, mas também no sistema límbico (Millan, 1999).

O início da transmissão dolorosa se dá em neurônios sensoriais primários de alto limiar, que também exercem a função de receptores e são chamados nociceptores. Estão subdivididos em mielinizados do tipo A e, não mielinizados do tipo C, ambos altamente especializados em transmitir informações dolorosas, apresentando corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal. As fibras mielínicas com maior espessura A β estão envolvidas na percepção tátil. As fibras mielínicas finas A δ e não-mielinizadas do tipo C transmitem a nocicepção e estímulos térmicos, mecânicos e químicos. A nocicepção normal envolve a detecção de temperaturas altas e baixas, assim como estímulos mecânicos intensos. Ambos nociceptores originam-se da pele e órgãos e terminam na camada superficial do corno dorsal na medula espinhal. Os axônios das células do corno dorsal transmitem impulsos nociceptivos para o tálamo e através deste ao córtex cerebral, que processa a consciência dolorosa (Baron, 2006; Gilron et al., 2006).

A estimulação nociva a algum tecido intacto causa uma dor de caráter protetor. Por outro lado, a dor patológica ocorre quando há inflamação ou lesão tecidual. Neste

caso, ocorre sensibilização periférica e central, com a liberação de mediadores químicos no local da lesão e em determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC), o que intensifica a transmissão nociceptiva. A partir destas alterações, há possibilidade de ocorrer modificações sensoriais peculiares da dor patológica, que são observadas através da existência de hiperalgesia, que traduz um aumento da sensibilidade local a estímulos potencialmente nocivos, além de alodínia, que representa uma resposta dolorosa a estímulos considerados inócuos (Millan, 1999).

Neste contexto, a dor pode ser classificada como: aguda, que é sinal de alerta para a presença de lesão tecidual, real ou potencial e, crônica, que é resultante da persistência de estímulos nociceptivos, sendo que esta última não pode ser considerada uma dor aguda de longa duração (Ribeiro et al., 2002).

Nociceção Aguda

Os principais mediadores liberados na presença de lesão ou inflamação tecidual são a substância P e o glutamato (Zhuo, 2007). Quando ocorre dano, esta informação é transmitida para o sistema SNC sem ocasionar nenhuma alteração. Porém, a inflamação instalada ativa receptores silenciosos, tornando os mesmos sensíveis aos estímulos mecânicos. Assim, ocorre persistência da neurotransmissão nociceptiva e, finalmente, a hipersensibilidade desenvolvida no local da lesão gera alodínia .

A neurotransmissão glutamatérgica representa um grande passo iniciador das alterações ocasionadas pela dor, pois o glutamato se liga a seus receptores NMDA, AMPA e cainato, provocando a despolarização pós-sináptica e propagação da informação nociceptiva (Baron, 2006). Outro evento que corrobora com aparecimento de hiperalgesia e alodínia é a ativação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que são responsáveis pela formação de óxido nítrico. Este, por sua vez, interfere na

nocicepção atuando como mensageiro retrógrado, pois se difunde para os neurônios pré-sinápticos do corno dorsal, estimulando a liberação de neurotransmissores nos terminais aferentes primários (Aimar et al., 1998; Meller and Gebhart, 1993; Vetter et al., 2001; Xu et al., 2007).

A glia também apresenta importância na modulação da nocicepção. Esta contém receptores de neurotransmissores, como glutamato e substância P, que ao se ligarem aos receptores correspondentes na glia, induzem a liberação de diversos mediadores como citocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas, óxido nítrico e outros (Costigan et al., 2009; Watkins et al., 2001).

Os receptores glutamatérgicos participam na transmissão nociceptiva, principalmente na informação dolorosa neurogênica e nos aspectos relacionados à hiperalgesia. A ativação prolongada e repetitiva das fibras aferentes C produzem um aumento progressivo da magnitude da resposta, ocasionando um aumento na excitabilidade, um fenômeno conhecido como *wind up*. O glutamato liberado pelas fibras C estimula seus receptores ionotrópicos, NMDA e AMPA, causando uma resposta pós-sináptica rápida. As fibras C também liberam substância P, que é um neuropeptídeo capaz de estimular a liberação de glutamato. Esse conjunto de eventos desencadeia diversas despolarizações pós-sinápticas e, assim, ativação das óxido nítrico sintases, que também têm ação estimulatória sobre a secreção de glutamato. Portanto, diversos feedbacks positivos elevam a concentração de glutamato na fenda sináptica (Zhuo, 2007).

Atualmente, existem diversos modelos animais de dor aguda que reproduzem os efeitos centrais e comportamentais ocorridos em humanos, dentre estes, destaca-se o modelo de nocicepção aguda induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, o principal agente pungente contido nas pimentas vermelhas (Komatsu et al., 2009).

Receptores TRPV1

Os receptores TRP foram originalmente observados em moscas do gênero *Drosophila*, onde funcionam como fotorreceptores. A resposta à luz mediada por estes receptores é reduzida após uma exposição prolongada; desta forma, esta família de receptores foi chamada de *transient receptor potencial*, TRP (Fein, 2009).

A família TRP é dividida em seis subtipos: TRPC, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA e TRPV1, ou receptor vanilóide. O TRPV1 é um canal seletivo para Ca^{+2} , que pode ser ativado pela capsaicina, além de ser estimulado por altas temperaturas e por faixas de pH menores que 6,5. Este receptor foi caracterizado através de testes de influxo de Ca^{+2} em células não-neuronais transfectadas com cDNA de um RNA de neurônios do gânglio da raiz dorsal (Caterina et al., 1997). O receptor TRPV1 é produzido nos neurônios do gânglio da raiz dorsal e transportado até a periferia (Cho and Valtschanoff, 2008).

A ativação dos receptores TRPV1 está relacionada a eventos periféricos e centrais (Chen et al., 2009). Durante o processo de hipersensibilidade central, uma variedade de alterações celulares e moleculares, tanto ao nível transcricional, quanto de tradução, pode ser desencadeada pela injeção intraplantar de capsaicina em pequenos roedores, através de mecanismos que envolvem a estimulação destes receptores .

Foi demonstrado que a administração intradérmica aguda de capsaicina modula a fosforilação do receptor NMDA de glutamato, especialmente das subunidades NR1 e NR2B. A NR1 é uma subunidade essencial para a formação do receptor NDMA, enquanto a subunidade NR2B é a mais expressa na espinha dorsal de ratos, sendo também muito importante em alterações dolorosas. Ademais, sabe-se que a ativação do

TRPV1 leva ao aumento de glutamato, tanto em níveis periféricos, quanto centrais, através de mecanismos que envolvem a produção de óxido nítrico (Zhang et al., 2005).

Outro neuromodulador que age nas sinapses glutamatérgicas é o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), uma neurotrofina bastante relevante nos processos dolorosos, que atua como mediador no corno dorsal da medula espinhal. O BDNF exerce a maior parte dos seus efeitos através da interação com os receptores TrkB (tirosina quinase B). A ativação destes receptores modula as sinapses primárias na medula espinhal e no hipocampo, liberando glutamato na área CA1 do hipocampo (Malcangio and Lessmann, 2003). Além destas ações, dados recentes da literatura demonstram que a ativação dos receptores TRPV1 causa intensificação de atividade central da glia, por meio da ativação das fibras C (Hathway et al., 2009). A glia atua liberando diversos mediadores, incluindo bradicinina, fator de crescimento neural (NGF) e prostaglandinas, que por sua vez, aumentam a mediação nociceptiva térmica do receptor TRPV1 (Katanosaka et al., 2008). Foi demonstrado que o antagonista de receptores TRPV1, o SB-366791 é capaz de inibir as sinapses glutamatérgicas (Lappin et al., 2006).

Um receptor envolvido com os efeitos decorrentes da ativação do TRPV1 é o receptor sigma-1, pertencente ao sistema opióide. Agonistas destes receptores causam efeito nociceptivo relacionado à ativação de vias glutamatérgicas. A ocorrência alodínia é observada após a ativação de receptores sigma (Entrena et al., 2009; Guitart et al., 2004). Recentemente foi evidenciado em camundongos *knockout* para o receptor sigma 1, a capacidade da injeção intraplantar de capsaicina não produzir hipersensibilidade, indicando uma forte relação entre a atividade dos receptores TRPV1 e sigma-1 (Entrena et al., 2009).

Outro estudo bastante relevante conduzido por (Chuang et al., 2007) demonstrou que a injeção intra-prostática de capsaicina produz aumento da expressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), além do aumento de células inflamatórias, dentre outros eventos. Acredita-se que a injeção intraplantar de capsaicina produz os mesmos efeitos em níveis centrais; porém, até o presente momento, não há trabalhos que demonstrem essa ação e sua correlação com a enzima COX-2.

Estresse Oxidativo e Neuromodulação

Radicais livres são espécies químicas com elétrons desemparelhados na sua configuração eletrônica, tornando estes compostos altamente reativos e lesivos aos constituintes normais. Embora a presença de oxigênio seja fundamental para o metabolismo celular, sua estrutura eletrônica favorece a formação de intermediários ativos ao oxigênio que podem ter efeitos nocivos (Fridovich, 1998; Gabbita et al., 2000).

O sistema nervoso tem particularidades que o leva a ser mais suscetível ao estresse oxidativo, incluindo as altas concentrações de ferro e o grande consumo de oxigênio. Além destes fatos, a grande concentração de ácidos graxos poliinsaturados no SNC faz com que estes sejam maiores alvos de lipoperoxidação, uma reação onde as moléculas orgânicas perdem um átomo de hidrogênio e um grupamento químico, alterando sua composição bioquímica (Dugan and Choi, 1999; Warner et al., 2004). As lesões nervosas periféricas ocasionam uma produção exacerbada de mediadores químicos inflamatórios e essa resposta é intensificada pela produção de radicais livres (Khalil and Khodr, 2001; Khalil et al., 1999). A concentração aumentada de aminoácidos excitatórios, um evento usual na nocicepção aguda, também pode acarretar estresse oxidativo no sistema nervoso central (Halliwell and Gutteridge, 1989). Estudos

demonstram que a atividade excessiva dos receptores NMDA está relacionada com o aparecimento de estresse oxidativo no sistema nervoso, levando à morte celular (Gabbita et al., 2000).

A dor aguda causada pela capsaicina intraplantar induz diversos eventos centrais e periféricos, neuromodulando sinapses e levando ao aparecimento do estado de estresse oxidativo central e periférico. Desta forma, o tratamento com antioxidantes pode ser uma alternativa viável para aliviar e alterações sensoriais através de ações em nível central.

Antioxidantes

O tratamento com substâncias antioxidantes diminui a degeneração hiperalgésica (Crisp et al., 2006; Khalil and Khodr, 2001; Kim et al., 2004; Naik et al., 2006). Entretanto, os mecanismos oxidantes não estão só presentes nas regiões periféricas, já que a injeção intratecal de Vitamina E reduz significativamente as alterações sensoriais após lesão nervosa periférica, possivelmente por diminuir a fosforilação do receptor NMDA no corno dorsal espinhal (Kim et al., 2004).

Em diversos modelos experimentais de dor neuropática, tanto por lesões, quanto por substâncias pró-nociceptivas, também foi demonstrado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas regiões centrais de processamento nociceptivo e esta ação é revertida por antioxidantes (Lee et al., 2007; Viggiano et al., 2005).

Atualmente, substâncias antioxidantes vêm sendo apontadas para o manejo de diversas doenças. O resveratrol (RSV), um polifenol obtido do vinho tinto, das cascas de uvas vermelhas e de alguns grãos, vem sendo muito estudado devido ao seu alto potencial antioxidante. A síntese deste composto ocorre naturalmente nas formas cis e trans; a forma trans está mais associada com as ações benéficas do resveratrol. O trans-

resveratrol pode ser convertido à forma cis na presença de luz, sendo assim um composto fotossensível (Doré, 2005).

Os principais órgãos alvo do RSV são fígado, rins, coração, ovários, pulmões e o cérebro. Devido à alta lipossolubilidade, este composto consegue cruzar a barreira hemato-encefálica, atingindo assim o SNC, justificando suas ações neuroprotetoras (Wang et al., 2004). A ação antioxidante do RSV deve-se ao fato dos grupamentos hidroxila do composto servirem de doadores de elétrons, neutralizando e sequestrando o radical hidroxila e o ânion superóxido, prevenindo a peroxidação lipídica (Leonard et al., 2003; Lopez-Velez et al., 2003; Mokni et al., 2007).

Há alguns estudos que demonstram efeitos benéficos marcantes para o RSV na reversão da neuropatia diabética. Sua ação benéfica também foi demonstrada em outros modelos de dor, como por exemplo, no modelo de ligação do nervo espinhal, atuando na atividade e expressão da enzima óxido nítrico sintase (Pérez-Severiano et al., 2008; Sharma et al., 2007b). A atividade antinociceptiva do RSV também parece estar relacionada com a modulação da COX-2 e do receptor aril-hidrocarbono (AhR), que quando ativado produz aumento transcrição celular. Outros mecanismos envolvem a diminuição das correntes de sódio, com aumento da permeabilidade ao potássio, diminuindo a despolarização neuronal (Gupta et al., 2004; Kim et al., 2004).

Foi demonstrado que a ação antinociceptiva do resveratrol pode ser revertida pela administração de naloxona, um antagonista opioide. Entretanto, não há evidências conclusivas sobre os efeitos do RSV em modelos de nocicepção aguda, como o modelo da capsaicina, bem como, sobre qual seriam os efeitos deste composto sobre os receptores TRPV1. (Gupta et al., 2004)

A realização do presente estudo baseia-se nas evidências da literatura que são apresentadas abaixo, que permitem correlacionar a nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina e as ações anti-nociceptivas do resveratrol:

1. *Cicloxygenase-2*: O resveratrol atua inibindo a atividade e expressão da COX-2; ademais, a injeção intraprostática de capsaicina aumenta a expressão desta enzima (Chuang et al., 2007; Gentili et al., 2001);
2. *c-Fos*: A expressão da proteína Fos, induzida por estímulo nocivo, pode também ter relação com neuroplasticidade à dor patológica e hiperalgesia produzidas também pela injeção de capsaicina e glutamato (Prado and Del Bel, 1998)
3. *Glutamato*: A administração de resveratrol modula as sinapses glutamatérgicas indiretamente, através da regulação da expressão e atividade da óxido nítrico sintase induzida. Já, a ativação de receptores TRPV1 ocasiona a facilitação da sinapse glutamatérgica (Pérez-Severiano et al., 2008; Peters et al., 2010; Sharma et al., 2007a).

Neste sentido, a investigação dos efeitos do resveratrol sobre as respostas centrais evocadas pela aplicação periférica de capsaicina e glutamato pode ser de extrema relevância para elucidar os mecanismos de ação deste composto anti-oxidante. Os principais objetivos do presente projeto foram desenhados com base nas evidências apresentadas acima e são apresentados a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo de *trans*-resveratrol no modelo de nocicepção espontânea induzida pela capsaicina e pelo glutamato na pata de camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar atividade antinociceptiva de RSV em diferentes testes de dor aguda;
- Verificar sítio de ação analgésica do RSV em diferentes testes de nocicepção;
- Verificar mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva de RSV através de imunohistoquímica, em fatias de córtex e medula, para COX-2 e c-Fos.

3. ARTIGO

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à revista *Neuropharmacology*, fator de impacto 4.677.

**New evidence on the mechanisms of action of resveratrol in acute models on
nociception in mice**

Karen O. Bazzo¹, André A. Souto², Thiago G. Lopes³, Marcus V. Gomez⁴, Alessandra
H. Souza^{1, 4, 5}, Maria M. Campos^{1, 4, 6*}

¹Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil; ²School of Chemistry, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Department of Pathology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Faculty of Medicine, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; ⁵Institute of Toxicology and Pharmacology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁶School of Dentistry, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Authors e-mail and address:

Karen Bazzo: E-mail: karenbazzo@gmail.com Address: Rua Olavo Bilac, B. Rio Branco, 293, Caxias do Sul, RS, Brazil.

André A. Souto: E-mail: arigony@pucrs.br Address: PUCRS, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, Brazil.

Thiago G. Lopes: E-mail: tgiulianni@yahoo.com.br Address: Avenida Ipiranga, 6690, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brazil.

Marcus V. Gomez: E-mail: marcusvgomez@gmail.com Address: Alfredo Balena, 190, Sala 114, B. Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Alessandra H. Souza: E-mail: alessandrahubnersouza@gmail.com Address: Alfredo Balena, 190, Sala 114, B. Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Maria M. Campos: E-mail: maria.campos@pucrs.br Address: PUCRS, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, Brazil.

***Corresponding Author:** Maria Martha Campos, School of Dentistry/Institute of Toxicology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 55 51 3320 3626.
E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br

1. Introduction

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage (Cheng et al., 2003; Merskey and Bogduk, 1994; Muralidharan and Smith, 2011). Pain is a major health problem that substantially reduces life quality and imparts high health costs and economic loss to society. Pain usually starts with activation of sensory receptors called nociceptors, which convey nociceptive information to the central nervous system (CNS). Nociceptor activation involves many pathways and mediators, such as glutamate, which is a pivotal neurotransmitter released in CNS (Young et al., 1995). Glutamate is responsible for major central alterations that occur in acute pain, mainly by activating ionotropic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Gold and Gebhart, 2010; Haley et al., 1992; Pereira et al., 2011; Woolf, 2010). TRPV1 receptors are non-selective cation channels that serve as receptors for noxious heat and vanilloids, such as capsaicin. This class of receptors is associated with central hypersensitivity, and molecular alterations at transcriptional and translational levels (Komatsu et al., 2009). The activation of both NMDA and TRPV1 receptors is deemed to be involved in central mechanisms of acute pain.

Resveratrol (RSV) is a polyphenol compound, which is found in a wide variety of plant species, being abundantly present in the seeds and skin of grapes. This compound has been reported to have multiple biological activities such as anti-inflammatory and anti-aging, antioxidant, anti-atherosclerotic, and anti-tumor activities (Azorín-Ortuño et al., 2011; Li et al., 2011; Yan-Shi, 2011; Yoon et al., 2011). Nevertheless, only some few studies have investigated the antinociceptive activities of RSV. For instance, significant antinociceptive effects have been demonstrated for RSV in the inflammatory hyperalgesia induced by carrageenan in rats (Gentilli et al., 2001).

Of note, it was demonstrated that antinociceptive activity of RSV can be reversed by the opioid antagonist naloxone (Gupta et al., 2004).

Animal models of acute pain, employing the administration of irritant agents such as capsaicin and glutamate, have been frequently used to study nociception mechanisms. Drug discovery and development continue to be a challenge, and new approaches for pain management are urgently required (Burgess and Williams, 2010; Enza et al., 2010). Following this rationale, in the present study, we have evaluated, for the first time, the effects of RSV in two acute models of spontaneous nociception, induced by capsaicin and glutamate in mice, with special attempts to determine the possible sites of action of RSV, as well as, some of the mechanisms implicated in its effects.

2. Methods

2.1. Animals

All animal care and experimental procedures were in accordance with the current guidelines of the National Institutes of Health (NIH). Animal experiments were approved by the local Animal Ethics Committee (protocol number: 10/00175). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of drug treatments.

Male Swiss mice (30 to 35 g, n=8 per group) were used. The animals were kept on a 12-h light/dark cycle (light on at 7:00) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, housed in plastic cages (six per cage), with filtered water and commercial food *ad libitum*, under controlled humidity (60 to 70 %) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). In all experiments, the animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing.

2.2. Drug administration protocols

Thirty min before the experimental sessions, the animals were placed individually in observation chambers. After this adaptation period, RSV treatments were given as follows: by oral route (p.o.) (50-200 mg/kg), intraplantarly (i.pl.) (25 $\mu\text{g/paw}$), intrathecally (i.t.) (150-600 $\mu\text{g/site}$, in 5 μl), all 30 min before testing, or by intracerebroventricular pathway (i.c.v.) (300 $\mu\text{g/site}$, in 5 μl), 10 min before. Control groups received saline solution at the same schedules of treatment. The doses and intervals of drug administration were selected on the basis of published data or pilot experiments (Falchi et al., 2010a; Granados-Soto et al., 2002; Ribas et al., 2008).

2.3. Nociceptive Behavior

2.3.1. Capsaicin-induced nociception

The method used for capsaicin-induced licking was similar to previously described (Sakurada et al., 1993). Following the appropriate intervals of time after RSV administration, 20 μ l of capsaicin (1.6 μ g per paw) were injected under the plantar surface of the right hindpaw (i.pl.). Animals were observed individually for 5 min for the time spent licking the injected paw (in s), which was considered as indicative of nociception.

2.3.2. Glutamate-induced nociception

The procedure adopted in the present study was similar to previously described study (Beirith et al., 2002). The animals were pre-treated with RSV at the suitable time intervals, and received an i.pl. injection of glutamate solution (10 μ mol per paw, 20 μ l) into the right hindpaw. Mice were observed individually for 15 min after glutamate injection, and the amount of time spent in licking the injected paw (in s) was considered as indicative of nociception.

2.3.4. Glutamate- or capsaicin-induced biting

This series of experiments was aimed at further investigating the possible central effects of RSV. For this purpose, we used the methodology previously described. (Ribas et al., 2008). Briefly, the animals received an i.t. injection containing glutamate (30 μ g in 5 μ l) or capsaicin (6.4 μ g in 5 μ l), into the subdural space of the L5–L6 spinal segments. The biting behavior was defined as a single head movement directed at the flanks or hind limbs, resulting in contact of the animal's snout (Hunskar et al., 1986).

RSV was administrated orally (100 mg/kg), 30 min before the nociception test, or it was co-injected with glutamate or capsaicin, by i.t. route (300 µg in 5 µl).

2.4. Immunohistochemistry

The expression of c-Fos and COX-2, which are known biochemical markers of nociception and inflammation, respectively, was measured by immunohistochemistry, as previously described by. The spinal cords and the brains were rapidly excised 60 min after capsaicin or glutamate application), and fixed in buffered neutral formalin. Sections were mounted onto gelatine-coated slides. Rabbit polyclonal antibodies raised against c-Fos and COX-2 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were diluted in Tris-buffered saline containing 0.3% Triton X-100, 2% donkey serum and 1% BSA, and the sections were incubated overnight at room temperature, before being incubated for 2 h with biotinylated donkey anti-rabbit antibody (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Germany), for 2 h with avidin-biotin peroxidase complex (1:1000; Vectastain ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), and finally revealed with diaminobenzidine via the nickel-enhanced glucose-oxidase method. The procedure also included negative controls with omission of the primary antibody, which did not show any immunoreaction. The images were captured by a digital camera (DS-5 M-L1, Nikon, NY, USA), connected to an optical microscope (Nikon Eclipse 50i) and analysed through the Image NIH Image J 1.36b Software. The number of c-Fos and COX-2 positive cells was quantified and expressed as the positive area per field (Labrousse et al., 2009). For this series of experiments, we have used four animals per group.

2.5. Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm standard error mean of 8 animals per group. The percentages of inhibition were calculated as the mean of inhibitions obtained for each individual experiment. Statistical comparison of the data was performed by t student test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test or Tukey test. P-values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered significant.

3. Results

3.1. Oral RSV reduces nociception induced by intraplantar injection of capsaicin or glutamate

The results demonstrate that oral administration of RSV was able to significantly reduce capsaicin-induced spontaneous nociception, at the doses of 50 and 100 mg/kg (25 ± 11 % and 36 ± 10 %, respectively) (Fig. 1A). Furthermore, the oral treatment with RSV (100 mg/kg) also produced a significant reduction of nociceptive behavior elicited by glutamate (39 ± 9 %) (Fig. 1B). These findings extend previous evidence on the systemic antinociceptive effects of RSV. Therefore, we decided to investigate whether RSV might be effective on capsaicin- or glutamate-induced nociception, when dosed by other routes of administration.

3.2. Intraplantar RSV reduces nociception induced by glutamate but not by capsaicin

In this experimental set, RSV was co-injected with capsaicin or glutamate into the hind paw. The results demonstrate that i.pl. administration of RSV was able to markedly reduce glutamate-induced spontaneous nociception (Fig. 1D) ($p < 0.05$; 67 ± 9 %), although it failed to significantly affect capsaicin-induced nociception (Fig. 1C). We might surmise that RSV acts via different pathways on capsaicin- and glutamate-caused painful reactions.

3.3. Intrathecal RSV reduces nociception induced by capsaicin but not by glutamate

When injected by i.t. route, RSV significantly reversed the nociception induced by capsaicin, either at the doses of 300 μ g or 600 μ g per site ($p < 0.05$), with percentages of inhibition 52 ± 15 % and 63 ± 13 %, correspondingly (Fig. 2A). On the other hand,

the i.t. administration of RSV did not elicit any alteration of glutamate-induced licking (Fig. 2B).

3.4. Intracerebroventricular RSV inhibits nociception induced by capsaicin but not by glutamate

The results show that i.c.v. administration of RSV displayed a partial inhibition of capsaicin-induced spontaneous nociception (Fig. 2C) ($p < 0.01$; 13 ± 2 %), without affecting glutamate-induced nociception (Fig. 2D). This evidence corroborates our hypothesis, indicating that RSV acts by different pathways depending on the nociceptive stimuli.

3.5. Intrathecal RSV reduces biting nociception induced by i.t. glutamate but not by i.t. capsaicin

When tested by i.t route, RSV was found able to significantly reduce glutamate-induced biting behavior (Fig. 2F) ($p < 0.05$, 29 ± 8 %), whereas it was not effective in changing capsaicin induced-biting (Fig. 2E). This indicates that RSV displays different effects on acute pain, depending on the route of administration of algogenic agents.

3.6. Immunohistochemistry for c-Fos following i.pl. injection of capsaicin or glutamate

To investigate whether RSV inhibition would be able to reduce the expression of the neuronal activation marker c-Fos, we have performed an immunohistochemistry analysis of lumbar spinal cord and cortex sections. RSV was administrated orally, at the dose of 100 mg/kg. This scheme of treatment resulted in a significant inhibition of capsaicin-induced increased of c-Fos expression, according to assessment in L3-L6 spinal segments (Fig. 3A) ($p < 0.01$). Otherwise, RSV was not capable of significantly

inhibiting capsaicin-induced increased in c-Fos levels at the brain cortex, although the immunolabeling was virtually reduced in RSV-treated animals (Fig. 3B, Fig. 3 representative images 3C panels a to h). The oral administration of RSV (100 mg/kg) also failed to affect the increase of c-Fos labeling in glutamate-injected mice, either in spinal cord (Fig. 4A) or brain sections (Fig. 4B). The representative images for these experiments are depicted in the Figure 4C, panels a to h.

3.7. COX-2 Immunohistochemistry

The administration of RSV (100 mg/kg, p.o.) resulted in a significant diminishment of COX-2 expression at L3-L6 spinal segments (Fig. 5A) and also in cerebral cortex sections from capsaicin-injected mice ($p < 0.05$) (Fig. 5B, representative images Figure 5C, panels a to h). Conversely, RSV did not interfere with COX-2 immunopositivity allied to glutamate i.pl. injection, in neither the spinal cord (Figure 6A) or cortex brain sections (Fig. 6B). The representative images for this series of experiments are depicted in Fig. 6C, panels a to h.

4. Discussion

The investigation of new molecules that are effective in management of nociception and inflammatory processes represents a very attractive field of research. The current analgesic therapeutic arsenal have been found to be only partially effective, and their use is commonly associated with serious side-effects (Jones, 2011).

RSV is a polyphenol, well-known by its anti-inflammatory and anti-tumoral actions (Busquets et al., 2007; Das and Das, 2007). Some few studies have reported analgesic effects for RSV, according to assessment in animal models of diabetic neuropathy, or in formalin and carrageenan tests, although its mechanisms of action remain to be determined (Pham-Marcou et al., 2008; Sharma et al., 2007; Torres-López et al., 2002). Therefore, the present study was designed to investigate the effects of RSV on the nociceptive responses induced by capsaicin and glutamate, when these nociceptive agents were injected into the mouse paw or by i.t. route. Some efforts have been made to determine the possible anatomical sites related to RSV effects on capsaicin- or glutamate-elicited pain behavior. We have also evaluated some of the mechanisms implicated in the systemic analgesic effects of RSV.

Initially, RSV was tested orally, and this compound was administered 30 min before the spontaneous nociception induced by capsaicin or glutamate, in doses ranging from 50 to 200 mg/kg. Of note, the oral treatment with RSV was able to produce a significant reduction of paw licking caused by either capsaicin or glutamate, without clear dose-related effects. Recent studies demonstrated a great analgesic effect for RSV at the dose of 100 mg/kg, p.o., in the capsaicin test, confirming our findings (Montiel-Ruiz et al., 2009). Nevertheless, to the present moment, there are no previous studies investigating the effects of RSV in the nociception induced by glutamate. Concerning the mechanisms related to the analgesic activity observed for RSV, it has been

suggested that RSV analgesia is partly mediated via opioid release, as this compound produces crossed-tolerance with morphine (Gupta et al., 2004).

In an attempt to verify the possible sites of action of this compound, we decided to evaluate the effects of RSV when given by other pathways of administration. Interestingly, the co-injection of RSV into the mouse paw, at the dose of 200 µg/site, was able to largely reverse the nociceptive responses elicited by glutamate, although it failed to significantly affect the pain-like behavior induced by capsaicin. It is worth mentioning that this dose of RSV was selected on the basis of previous studies (Granados-Soto et al., 2002), and it was found active in the formalin test. Our data on the capsaicin model allow us to suggest that RSV does not act peripherally in relation to TRPV1 activation. Otherwise, it is feasible to consider that RSV might interfere with glutamate receptors, namely NMDA, at periphery sites. In a previous study conducted in rats, it was demonstrated that peripheral antinociceptive effects of RSV in the formalin model are likely related to the opening of large and small conductance Ca^{2+} activated K^+ channels, but not ATP-sensitive K^+ channels (Granados-Soto et al., 2002). This might well explain the actions of RSV on glutamate-induced pain, when this algogenic agent is injected into the mouse hindpaw.

As another experimental approach, we have further evaluated the actions of RSV, when this compound was given by i.t. route. The doses used by us were based on the previous study published by (Pérez-Severiano et al., 2008). Significant effects were observed for RSV at the doses of 300 and 600 µg/site, when nociception was induced by capsaicin, but not by glutamate. This is highly suggestive for a central antinociceptive action for RSV in the capsaicin model. We might suggest that RSV might interfere with TRPV1 activation at the spinal levels of pain processing. Accordingly, some studies on chronic nociception have suggested that RSV could

activate the proteins of the NO–cyclic GMP–PKG pathway or large-conductance Ca^{2+} -activated, but not ATP-sensitive, K^+ channels at the spinal cord, restoring altered NOS activity and expression, what led to a reduction of allodynia in neuropathic rats (Pérez-Severiano et al., 2008).

To additionally assess the central effects of RSV, this compound was injected i.c.v., at the dose of 300 $\mu\text{g}/\text{site}$. Again, a partial, but significant antinociceptive effect was found in the capsaicin model, but not in the glutamate-induced pain behavior. To our knowledge, until the moment, there are no studies showing the effects of RSV when injected by i.c.v. route, in the nociception context. Of note, a previous publication has demonstrated that i.c.v. administration of RSV was able to exhibit anti-diabetic actions in mice (Ramadori et al., 2009). Nevertheless, this series of experiments reinforce the previous hypothesis that RSV probably interferes with central pain transmission via TRPV1 receptor activation, although the spinal cord seems to be a most important site of action for RSV.

To further investigate the analgesic effects of RSV, we have analyzed the biting behavior evoked by the i.t. injection of glutamate or capsaicin, by application into the subdural space of the L5–L6 spinal segments. Unexpectedly, the combination of RSV was able to reverse the biting behavior induced by glutamate, whilst it failed to significantly alter the biting activity elicited by i.t. injection of capsaicin. Nevertheless, at the CNS, RSV is known to inhibit Na^+ currents in the dorsal root ganglion neurons (Kim et al., 2005). It might be hypothesized that RSV exerts suppression or antagonism on the kinetics of Na^+ currents, affecting the excitability of the dorsal root neurons, and consequently glutamate-induced biting. Of note, it was recently demonstrated that i.t. injection of guanosine, a guanine based-purine, inhibited the nociceptive response induced by i.t. injection of glutamate, although it failed to affect capsaicin-mediated

biting response in mice (Schmidt et al., 2009), as showed for RSV in the present study. It is tempting to propose that RSV is able to interfere with the signaling pathways activated by glutamate in the spinal cord, following the activation of either ionotropic or metabotropic receptors. Concerning the capsaicin model, our data is highly suggestive for a central antinociceptive action for RSV, when this compound was dosed 10 min before capsaicin-induced spontaneous nociception. Otherwise, RSV failed to significantly alter the biting behavior elicited by i.t. injection of capsaicin, when administered concurrently at the spinal level. To interpret our data, we also need to consider that the capsaicin concentration and/or the site of injection of this pungent agent might directly influence the open and closed TRPV1 channel states, likely via PKC-mediated phosphorylation, what can be responsible for the differences in the effects of RSV, as observed by us (Hui et al., 2003; Studer and McNaughton, 2010).

The systemic analgesic action of RSV observed in the two models of acute pain led us to further investigate the possible mechanisms underlying these effects. COX-2 is responsible for the elevated production of prostanoids at the inflammatory sites (Warner and Mitchell, 2004). Previous studies have demonstrated that RSV is effective in blocking both the expression and the activity of COX-2 (Pham-Marcou et al., 2008). The analgesic activity of RSV seems to be related to various pathways of the pain control. COX-2 inhibition and K^+ channel opening have been suggested as the main underlying mechanisms (Bertelli et al., 2008; Falchi et al., 2010b). In the present study, we clearly demonstrate that i.pl. injection of capsaicin into the mouse paw resulted in a marked increase of COX-2 immunopositivity in spinal cord and cortex sections, which likely contributes to development of central sensitization. It has been previously shown that intraprostatic injection of capsaicin resulted in increased central expression of COX-2 (Chuang et al., 2007). Interestingly, the oral administration of RSV to mice was

able to significantly reduce capsaicin-induced COX-2 expression in both the spinal cord and the brain cortex. These findings allow us to suggest that RSV might affect COX-2 induction, when nociception involves the activation of TRPV1 receptors by capsaicin.

A recent publication demonstrated that excitotoxic events lead to increased COX-2 expression, supporting our results on the increased central levels of COX-2 after glutamate peripheral injection. However, the systemic treatment with RSV failed to affect the up-regulation of COX-2, according to assessment at the spinal cord or the brain cortex of glutamate-injected mice (Stark and Bazan, 2011). This might explain, at least in part, the absence of effects of RSV on glutamate-induced licking, when this compound was administered by i.t. or i.c.v. routes.

Nociceptive stimulus modulates several pathways and influence transcriptional and translational levels of many molecules, including the activation of immediate genes, such as c-Fos, which has been markedly associated to nociception (Liu et al., 2011). Thus, we also decided to evaluate whether the systemic administration of RSV could affect c-Fos expression in the CNS. It was previously demonstrated that TRPV1 peripheral activation induced by capsaicin lead to modifications on spinal cord glia in mice (Chen et al., 2009), resulting in increased c-Fos expression (Hossaini et al., 2011). These pieces of evidence corroborate our data showing that capsaicin injection into the mouse paw resulted in a significant increase of c-Fos immunelabeling at both the spinal cord and brain cortex segments. Notably, in our study, RSV significantly reduced the c-Fos expression-induced by capsaicin in the spinal cord, but not in the cortex. On the basis of this data, it is tempting to suggest that RSV mechanisms of action probably involve the modulation of TRPV1 activation in the spinal cord, allied to changes in c-Fos expression. We can also infer that the most prominent effects of RSV when injected

by i.t., in comparison to i.c.v route, in the capsaicin model, might be consequence of modulation of spinal c-Fos expression.

It was previously demonstrated that i.pl. injection of glutamate induced an elevation of c-Fos levels in the mouse spinal cord (Lin et al., 2009). Our results confirm and extend this evidence showing that application of glutamate into the mouse paw resulted in a marked increase of c-Fos immunopositivity in either the spinal cord or the brain cortex. Nevertheless, the oral administration of RSV failed to affect glutamate-induced c-Fos activation in both anatomical sites. This is in accord with functional data obtained in the licking model, further confirming that RSV acts peripherally, when the nociception is induced by glutamate. However, additional studies are necessary to confirm this hypothesis.

4.1. Conclusions

Collectively, our data bring novel evidence on the possible mechanisms of action of RSV in pain processing. Therefore, the oral administration of RSV elicited antinociceptive effects in the licking models induced by both capsaicin and glutamate. From the experiments using different routes of administration, it is possible to conclude that in the case of capsaicin, RSV appears to affect the spinal TRPV1 activation, via mechanisms likely involving c-Fos activation and COX-2 expression. Otherwise, in the glutamate-induced licking, the actions of RSV seem to take place mainly at peripheral sites. Nevertheless, RSV also displayed antinociceptive effects in glutamate-induced biting behavior, indicating the relevance of additional mechanisms of action for that naturally-based compound. An overall analysis of our results allows us to suggest that mechanisms of action of RSV might be different depending on the algogenic stimulus, as well as the site of administration.

5. Financial Support: CAPES, AUX-PE Toxinologia, CNpq and PUCRS

Abbreviations:

RSV – resveratrol; i.c.v. – intracerebroventricular; i.t. – intrathecal; i.pl. – intraplantar; p.o. – oral route; NMDA – N-metil D-Aspartate; TRPV – Transient Receptor Potential Vanilloid 1; TRPV1 – Transient Receptor Potential Vanilloid type 1; NO- nitric oxide; ATP- adenosine triphosphate; GMP–PKG- guanine monophosphate- G kinase protein ; CNS – Central Nervous Sistem; COX-2 – Ciclooxygenase 2; NOS – nitric oxide sinthase.

Acknowledgements

K. O. B. is a mastership postgraduate student in Medicine and Health Sciences receiving grants from Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A.H.S. is a post-doc student receiving financial support from Capes. We would like to thank Mr. Juliano Soares by his technical assistance.

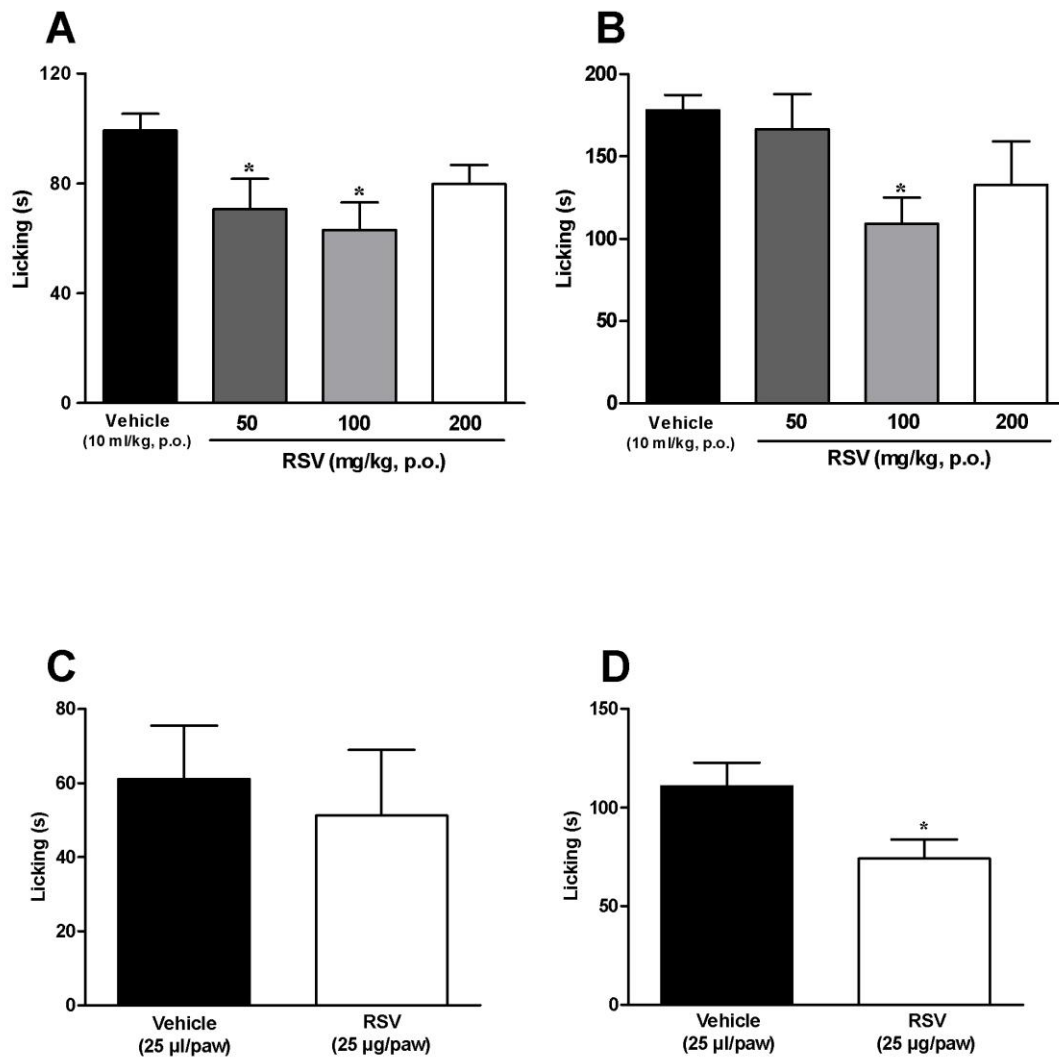


Fig 1. Effect of p.o. administration of RSV (50-200 mg/kg) 30 min before capsaicin-induced spontaneous nociception (A) and nociceptive behavior elicited by glutamate (B). Effect of i.pl. administration of RSV 30 min (200 µg in 25µl) before capsaicin-induced spontaneous nociception (C) and nociceptive behavior elicited by glutamate (D). Results are expressed as the mean \pm sem for 8 animals per group.* $p < 0.05$ by Dunnett's test compared with the vehicle-treated group.

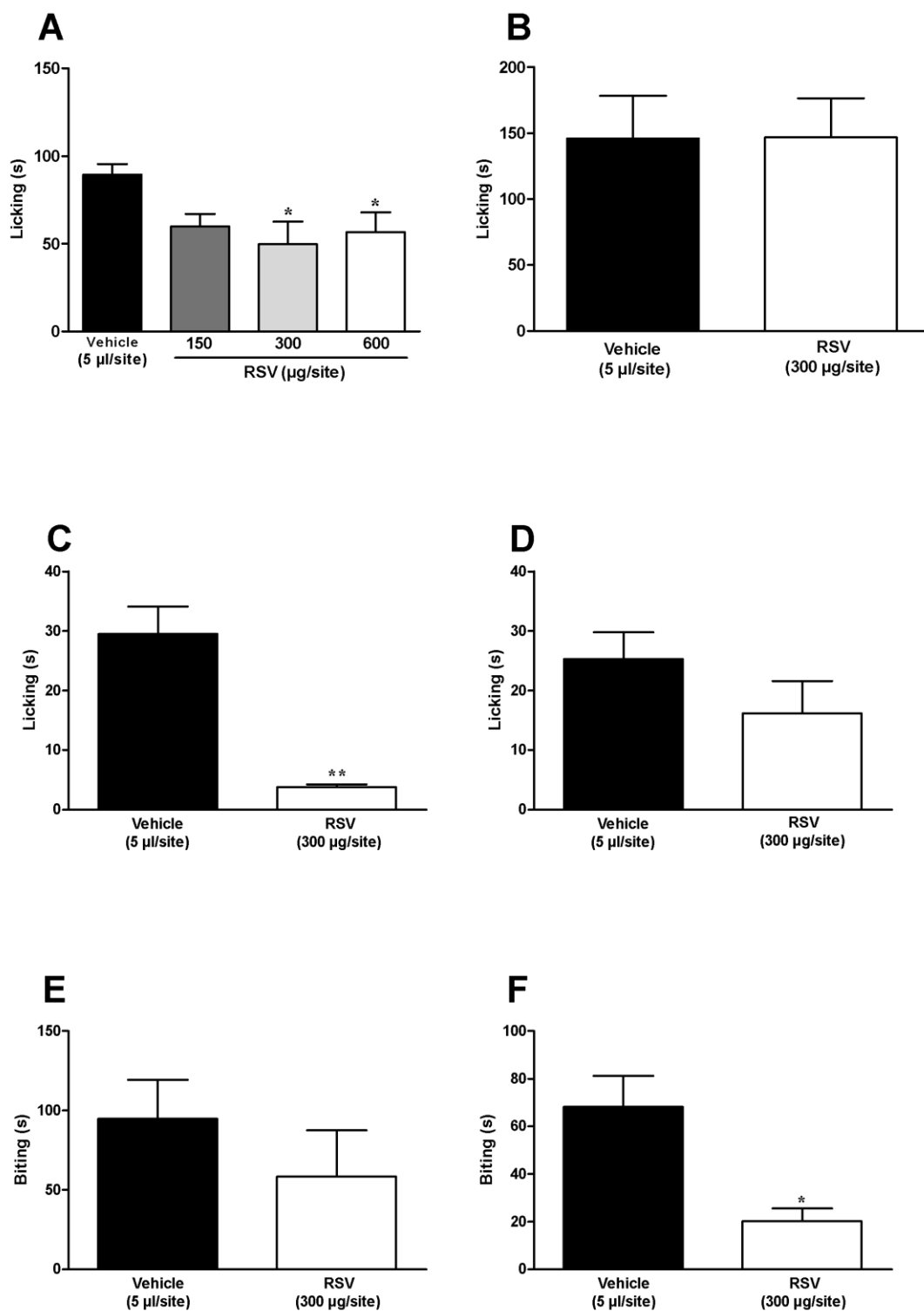


Fig 2. Effect of i.t. administration of RSV 10 min before capsaicin-induced spontaneous nociception (A) and nociceptive behavior elicited by glutamate (300 µg/ 5µl) (B). Effect of i.c.v. administration of RSV 10 min (300 µg/ 5µl) before capsaicin-induced

spontaneous nociception (C) and nociceptive behavior elicited by glutamate (D). Effect of i.t. administration of RSV with capsaicin-induced spontaneous nociception (6.4 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) (E) and nociceptive behavior elicited by glutamate (6 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) (F). Each column represents the mean \pm sem for 8 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, by Dunnett's test compared with the vehicle-treated group.

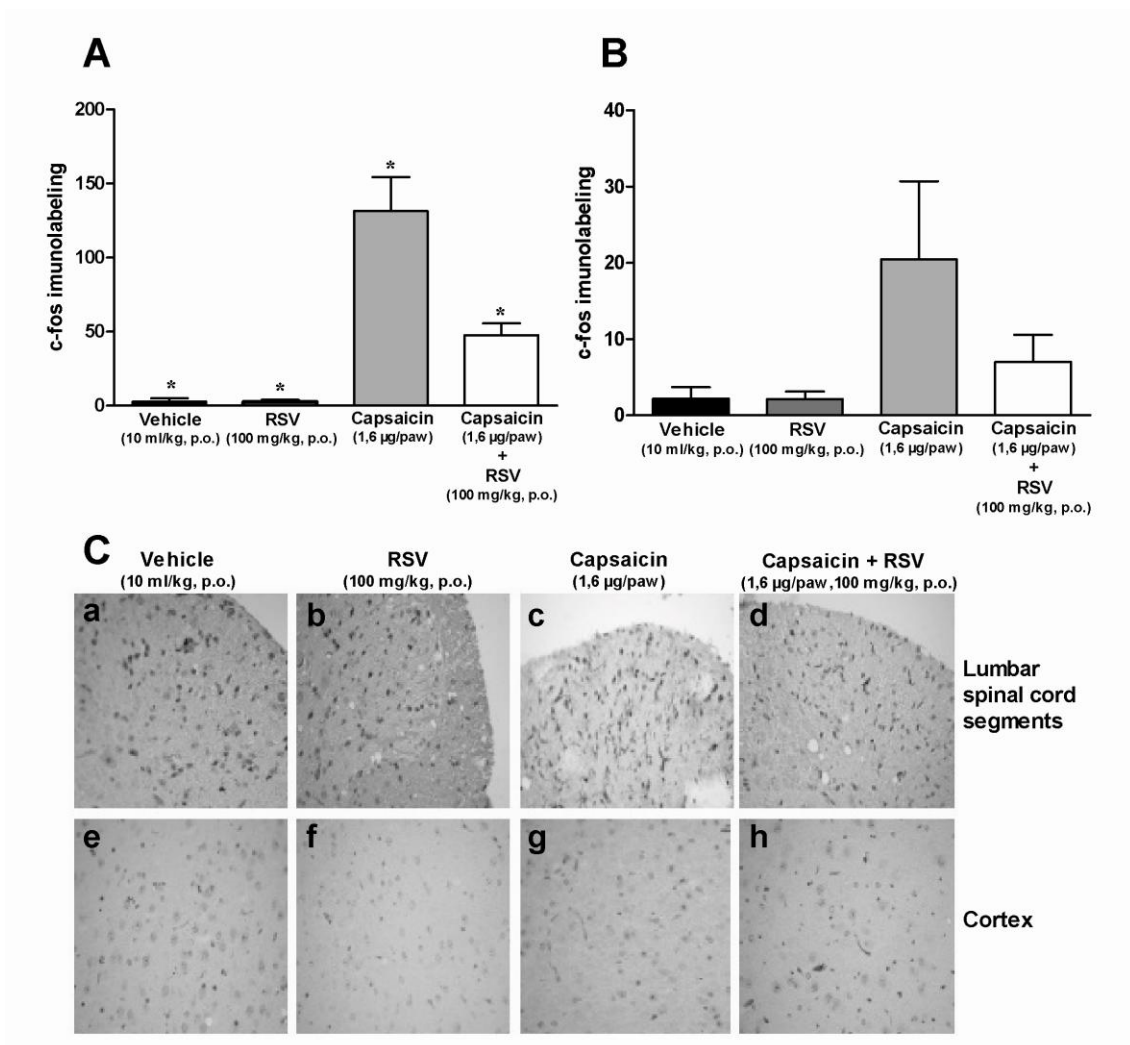


Fig 3. Immunohistochemistry analysis for c-fos, mice treated with RSV (100 mg/kg) administered p.o., 30 min before capsaicin injection. Graphic representation of immunostaining for c-fos in spinal cord (A) and cortex (B). * $p < 0,05$. Immunohistochemistry representation (C) by Tukey's test compared with the vehicle-treated group. Results are expressed as the mean \pm sem for 4 animals per group.

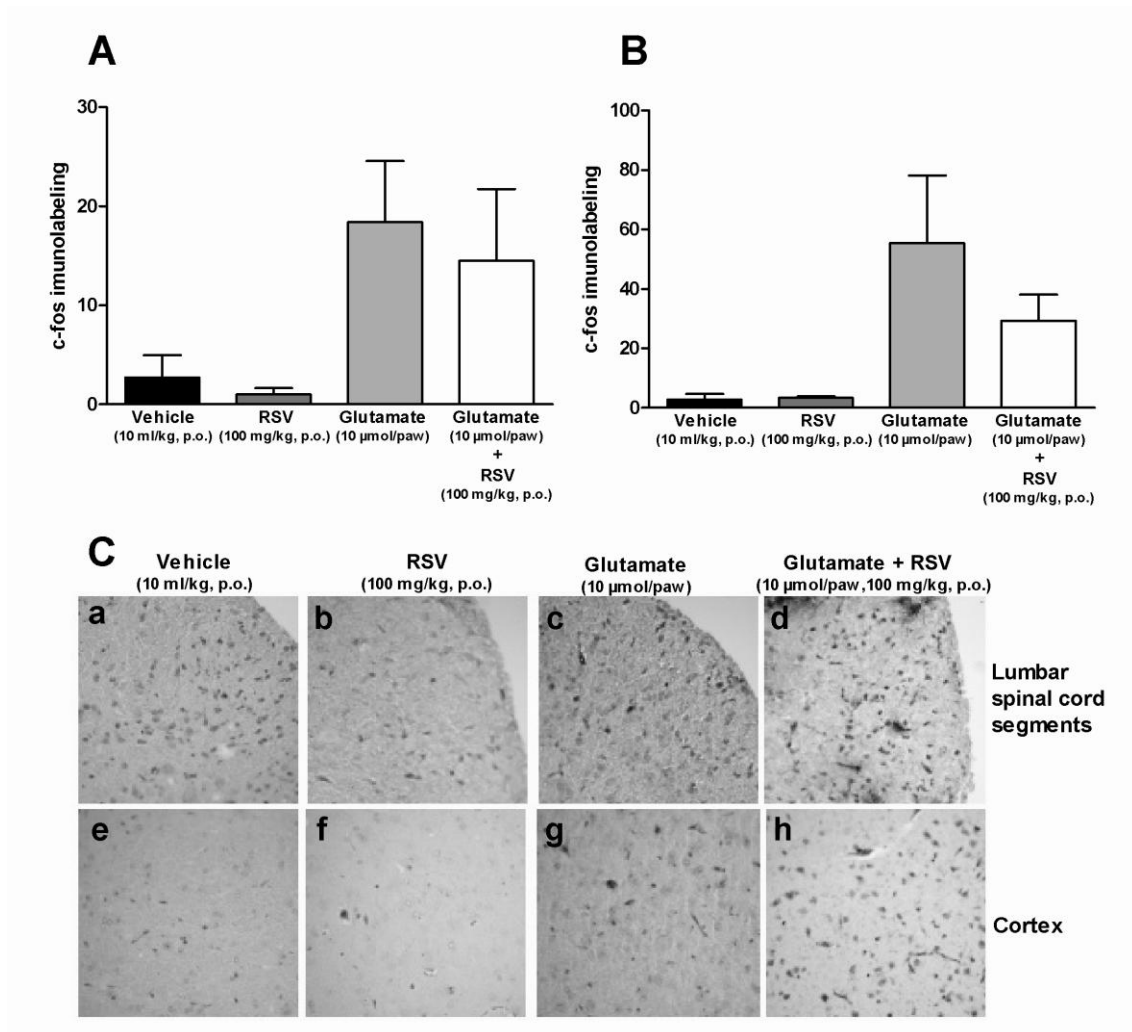


Fig 4. Immunohistochemistry analysis for c-fos, mice treated with RSV (100 mg/kg) administered p.o., 30 min before glutamate injection. Graphic representation of immunostaining for c-fos in spinal cord (A) and cortex (B). Immunohistochemistry representation (C), by Tukey's test compared with the vehicle-treated group. Results are expressed as the mean \pm sem for 4 animals per group.

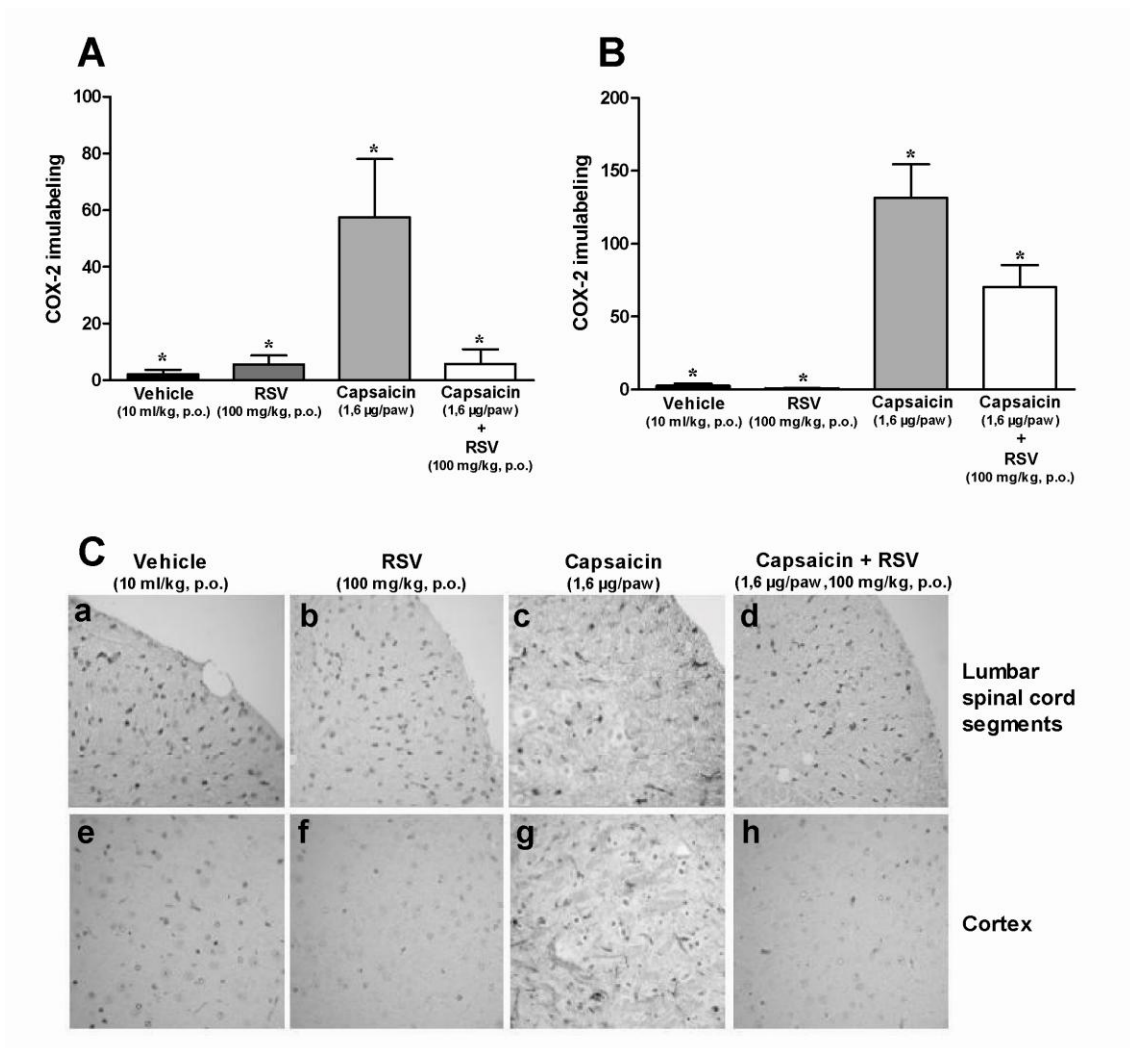


Fig 5. Immunohistochemistry analysis for COX-2, mice treated with RSV (100 mg/kg) administered p.o., 30 min before capsaicin injection. Graphic representation of immunostaining for COX-2 in spinal cord (A) and cortex (B). * $p < 0,05$. Immunohistochemistry representation (C), by Tukey's test compared with the vehicle-treated group. Results are expressed as the mean \pm sem for 4 animals per group.

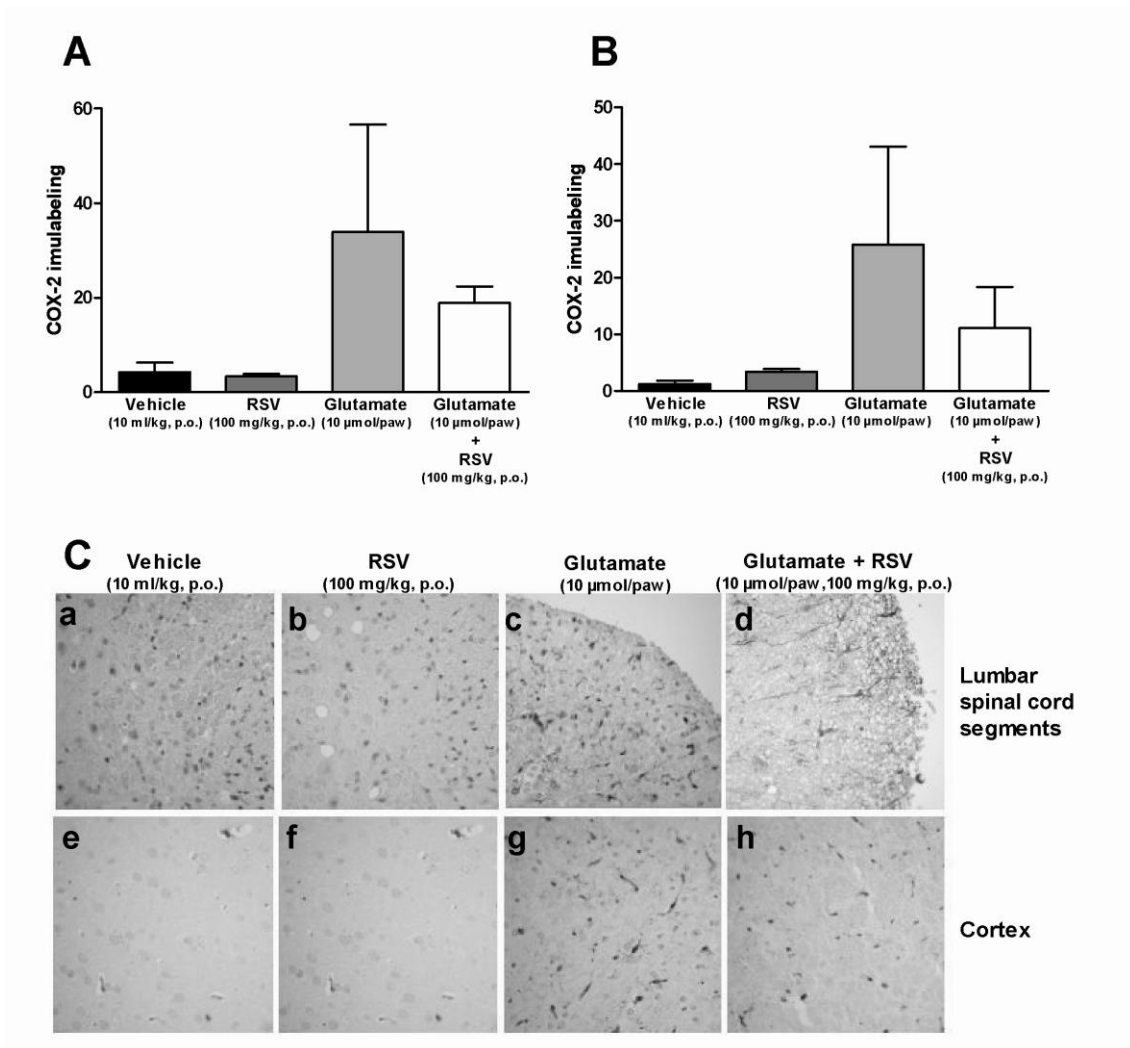


Fig 6. Immunohistochemistry analysis for COX-2, mice treated with RSV (100 mg/kg) administered p.o., 30 min before glutamate injection. Graphic representation of immunostaining for COX-2 in spinal cord (A) and cortex (B). Immunohistochemistry representation (C), by Tukey's test compared with the vehicle-treated group. Results are expressed as the mean \pm sem for 4 animals per group.

6. References

- Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M. J., González-Sarrías, A., Larrosa, M., Vallejo, F., Pallarés, F. J., Lucas, R., Morales, J. C., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., 2011. Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: a transcriptomic approach to disease prevention. *J Nutr Biochem*.
- Beirith, A., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 924, 219-228.
- Bertelli, A., Falchi, M., Dib, B., Pini, E., Mukherjee, S., Das, D. K., 2008. Analgesic resveratrol? *Antioxid Redox Signal* 10, 403-404.
- Burgess, G., Williams, D., 2010. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J Clin Invest* 120, 3753-3759.
- Busquets, S., Ametller, E., Fuster, G., Oliván, M., Raab, V., Argilés, J. M., López-Soriano, F. J., 2007. Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model. *Cancer Lett* 245, 144-148.
- Chen, Y., Willcockson, H. H., Valtschanoff, J. G., 2009. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp Neurol* 220, 383-390.
- Cheng, S. F., Foster, R. L., Huang, C., 2003. Concept Analysis of Pain. *Tzu Chi Nursing Journal* 2, 20-29.
- Chuang, Y. C., Yoshimura, N., Wu, M., Huang, C. C., Chiang, P. H., Tyagi, P., Chancellor, M. B., 2007. Intraprostatic capsaicin injection as a novel model for nonbacterial prostatitis and effects of botulinum toxin A. *Eur Urol* 51, 1119-1127.
- Das, S., Das, D. K., 2007. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6, 168-173.
- Enza, P., Livio, L., de Novellis Vito, B. L., Francesco, R., Sabatino, M., 2010. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain* 6.
- Falchi, M., Bertelli, A., Galazzo, R., Viganò, P., Dib, B., 2010a. Central antalgic activity of resveratrol. *Arch Ital Biol* 148, 389-396.
- Falchi, M., Bertelli, A., Galazzo, R., Viganò, P., Dib, B., 2010b. Central antalgic activity of resveratrol. *Arch Ital Biol* 148, 389-396.
- Gentili, M., Mazoit, J. X., Bouaziz, H., Fletcher, D., Casper, R. F., Benhamou, D., Savouret, J. F., 2001. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci* 68, 1317-1321.
- Gold, M. S., Gebhart, G. F., 2010. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16, 1248-1257.

- Granados-Soto, V., Argüelles, C., Ortiz, M., 2002. The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology* 43, 917-923.
- Gupta, Y. K., Sharma, M., Briyal, S., 2004. Antinociceptive effect of trans-resveratrol in rats: Involvement of an opioidergic mechanism. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 667-672.
- Haley, J., Dickenson, A., Schachter, M., 1992. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 31, 251-258.
- Hossaini, M., Sara, J., Jongen, J., Holstege, J., 2011. C-fos activation of spinal glycinergic and GABAergic neurons is increased after capsaicin stimulation in rats with contralateral chronic pain. *Neuroscience* 176, 265-275.
- Hui, K., Liu, B., Qin, F., 2003. Capsaicin activation of the pain receptor, VR1: multiple open states from both partial and full binding. *Biophys J* 84, 2957-2968.
- Hunskar, S., Post, C., Fasmer, O., Arwestrom, E., 1986. Intrathecal injection of capsaicin can be used as a behavioural nociceptive test in mice. *Neuropharmacology* 25, 1149-1153.
- Jones, A. W., 2011. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test Anal* 3, 337-344.
- Kim, H. I., Kim, T. H., Song, J. H., 2005. Resveratrol inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1045, 134-141.
- Komatsu, T., Sasaki, M., Sanai, K., Kuwahata, H., Sakurada, C., Tsuzuki, M., Iwata, Y., Sakurada, S., Sakurada, T., 2009. Intrathecal substance P augments morphine-induced antinociception: Possible relevance in the production of substance P N-terminal fragments. *Peptides* 30, 1689-1696.
- Labrousse, V. F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudéry, M., Ferreira, G., Amédée, T., Layé, S., 2009. Impaired Interleukin-1 and c-Fos Expression in the Hippocampus Is Associated with a Spatial Memory Deficit in P2X7 Receptor-Deficient Mice. *PLoS one* 4, e6006.
- Li, H., Yan, Z., Zhu, J., Yang, J., He, J., 2011. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology* 60, 252-258.
- Lin, Y. R., Chen, H. H., Lin, Y. C., Ko, C. H., Chan, M. H., 2009. Antinociceptive actions of honokiol and magnolol on glutamatergic and inflammatory pain. *J Biomed Sci* 16, 94.
- Liu, C. R., Duan, Q. Z., Wang, W., Wei, Y. Y., Zhang, H., Li, Y. Q., Wu, S. X., Xu, L. X., 2011. Effects of intrathecal isoflurane administration on nociception and Fos expression in the rat spinal cord. *Eur J Anaesthesiol* 28, 112-119.

- Merskey, H., Bogduk, N., 1994. Classification of chronic pain, IASP Task Force on Taxonomy. Seattle: IASP Press.
- Montiel-Ruiz, R. M., Reyes-García, G., Flores-Murrieta, F., Déciga-Campos, M., 2009. Antinociceptive Interaction Between Benfotiamine and Resveratrol in Capsaicin-Induced Licking. *Proc West Pharmacol Soc* 52, 67-71.
- Muralidharan, A., Smith, M. T., 2011. Pain, analgesia and genetics. *J Pharm Pharmacol* 63, 1387–1400.
- Pereira, P. J. S., Lazarotto, L. F., Leal, P. C., Lopes, T. G., Morrone, F. B., Campos, M. M., 2011. Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase γ reduces pruriceptive, inflammatory, and nociceptive responses induced by trypsin in mice. *Pain* 152, 2861-2869.
- Pérez-Severiano, F., Bermúdez-Ocaña, D. Y., López-Sánchez, P., Ríos, C., Granados-Soto, V., 2008. Spinal nerve ligation reduces nitric oxide synthase activity and expression: Effect of resveratrol. *Pharmacol Biochem Behav* 90, 742-747.
- Pham-Marcou, T. A., Beloeil, H., Sun, X., Gentili, M., Yaici, D., Benoit, G., Benhamou, D., Mazoit, J. X., 2008. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain* 140, 274-283.
- Ramadori, G., Gautron, L., Fujikawa, T., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Coppari, R., 2009. Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. *Endocrinology* 150, 5326-5333.
- Ribas, C. M., Meotti, F. C., Nascimento, F. P., Jacques, A. V., Dafre, A. L., Rodrigues, A. L. S., Farina, M., Soldi, C., Mendes, B. G., Pizzolatti, M. G., 2008. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103, 43-47.
- Sakurada, T., Katsumata, K., Yogo, H., Tan-No, K., Sakurada, S., Kisara, K., 1993. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. *Neurosci Lett* 151, 142-145.
- Schmidt, A. P., Böhmer, A. E., Schallenberger, C., Antunes, C., Pereira, M. S. L., Leke, R., Wofchuk, S. T., Elisabetsky, E., Souza, D. O., 2009. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by guanosine in mice. *Eur J Pharmacol* 613, 46-53.
- Sharma, S., Kulkarni, S. K., Chopra, K., 2007. Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 21, 89-94.
- Stark, D. T., Bazan, N. G., 2011. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Differentially Modulate Neuronal Cyclooxygenase-2 Function, Lipid Peroxidation, and Neuroprotection. *J Neurosci* 31, 13710-13721.

Studer, M., McNaughton, P. A., 2010. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J Physiol* 588, 3743-3756.

Torres-López, J. E., Ortiz, M. I., Castañeda-Hernández, G., Alonso-López, R., Asomoza-Espinosa, R., Granados-Soto, V., 2002. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci* 70, 1669-1676.

Warner, T. D., Mitchell, J. A., 2004. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 18, 790-804.

Woolf, C. J., 2010. What is this thing called pain? *J Clin Invest* 120, 3742.

Yan-Shi, G., 2011. Recent Anti-aging Studies on Caloric Restriction and Resveratrol. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 42, 161-164.

Yoon, D. H., Kwon, O. Y., Mang, J. Y., Jung, M. J., Kim, D. Y., Park, Y. K., Heo, T. H., Kim, S. J., 2011. Protective potential of resveratrol against oxidative stress and apoptosis in Batten disease lymphoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 14, 49-52.

Young, M., Fleetwood-Walker, S., Mitchell, R., Dickinson, T., 1995. The involvement of metabotropic glutamate receptors and their intracellular signalling pathways in sustained nociceptive transmission in rat dorsal horn neurons. *Neuropharmacology* 34, 1033-1041.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cada ano, novos medicamentos são lançados no mercado, favorecendo o aumento da expectativa de seus usuários e o melhor controle das doenças. Os agentes terapêuticos medicamentosos modernos têm contribuído favoravelmente contra as várias moléstias que acometem a humanidade. No entanto, em algumas situações, seu uso cria efeitos indesejáveis à saúde (Mahmud et al., 2006).

Estudos e registros sobre intoxicações e reações adversas em vários países, incluindo o Brasil, demonstram que os medicamentos são responsáveis por grande parte dos atendimentos nos Centros de Controle de Intoxicações e, em especial, os analgésicos. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos com minimização de efeitos adversos torna-se uma abordagem relevante para a realidade atual (Gandolfi and Andrade, 2006; Kawano et al., 2006; Santos and Nitrini, 2004).

Neste estudo, demonstramos o efeito antinociceptivo do RSV em dois modelos de nocicepção aguda induzida por capsaicina e glutamato. Interessantemente, uma única dose via oral mostrou-se efetiva em ambos modelos, indicando uma ação farmacológica satisfatória para o composto. Quando testado por outras vias de administração, o RSV apresentou diferentes sítios de ação, conforme o estímulo nociceptivo. No caso da nocicepção induzida pela capsaicina, que envolve a ativação de receptores TRPV1, o efeito analgésico foi central; já, na nocicepção induzida pela ativação de canais NDMA, após a injeção de glutamato, o RSV parece exercer uma ação periférica.

Para investigar o mecanismo de ação do RSV, o marcador de ativação neural, c-Fos, e a enzima ciclooxigenase 2, COX-2, foram quantificados em fatias de medula espinhal e cortex através de imunohistoquímica. Os níveis de c-Fos mostraram-se elevados nos segmentos da medula espinhal quando a nocicepção foi induzida pela

capsaicina; neste modelo; foi possível observar a modulação de COX-2 no córtex e na medula espinhal, confirmando os dados comportamentais que indicam a ação central de RSV no modelo de nocicepção causado pela aplicação i.p.l. induzida pela capsaicina (Figura 1).

Já, no modelo de nocicepção causada por glutamato, os níveis de c-Fos e COX-2 não foram significativamente elevados em fatias de medula espinhal e córtex, embora haja uma tendência vista na quantificação destes marcadores, confirmando assim, os dados obtidos nas análises comportamentais que indicaram ação periférica de RSV, quando a nocicepção foi induzida pela ativação de receptores NDMA (Figura 1).

Baseado no fato de que atualmente poucos estudos esclarecem a ação do RSV em modelos de nocicepção, o presente trabalho evidenciou novos mecanismos de ação para este composto. De fato, na literatura, são propostos diversos mecanismos de ação distintos para o RSV, embora existam poucas evidências que expliquem os seus efeitos antinociceptivos;

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que: (i) o RSV tem efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção espontânea induzida por capsaicina e glutamato; (ii) quando a nocicepção envolve a ativação de receptores TRPV1, este efeito tem como sítio de ação o SNC, envolvendo o aumento da expressão de c-Fos e COX-2; (iii) no caso da nocicepção que envolve a ativação de receptores NDMA, este mecanismo de ação ocorre na região periférica, ou, referente ao local de indução, não envolvendo modificações de expressão de c-Fos ou COX-2. Desta forma, o presente trabalho contribui para os conhecimentos atuais sobre este composto, fornecendo evidências importantes sobre o RSV.

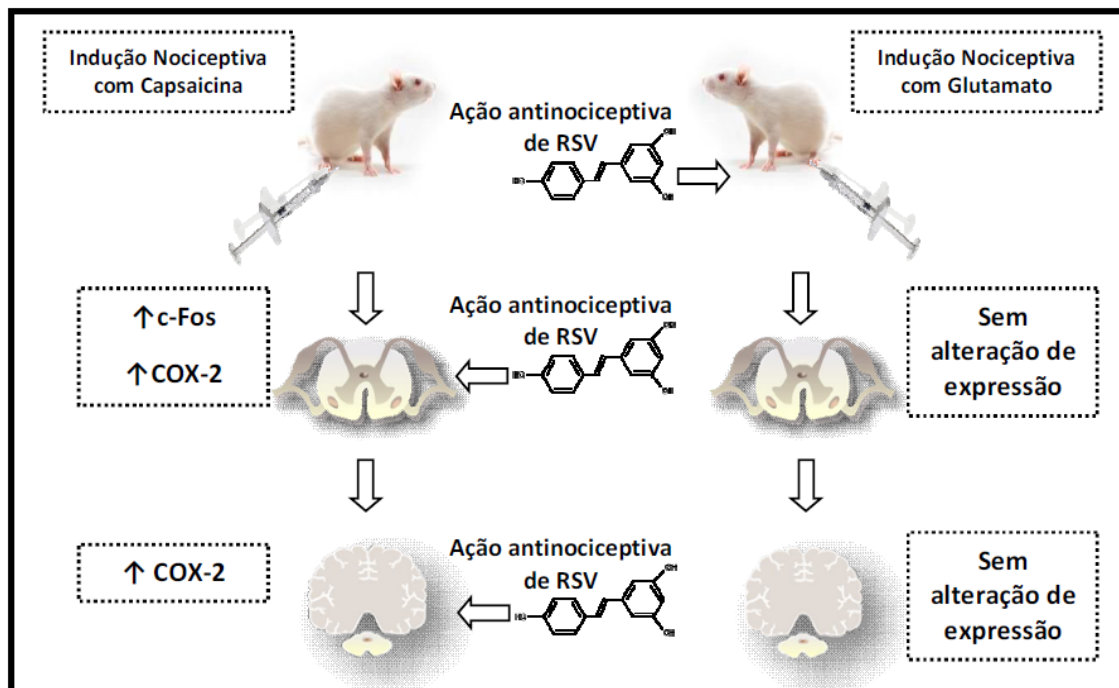


Figura 1. Representação gráfica do mecanismo de ação do RSV em dois modelos de nociceção aguda.

4. REFERÊNCIAS

- Aimar, P., Pasti, L., Carmignoto, G., Merighi, A., 1998. Nitric oxide-producing islet cells modulate the release of sensory neuropeptides in the rat substantia gelatinosa. *The Journal of neuroscience* 18, 10375.
- Baron, R., 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nature Clinical Practice Neurology* 2, 95-106.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Chen, Y., Willcockson, H. H., Valtschanoff, J. G., 2009. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp Neurol* 220, 383-390.
- Cheng, S. F., Foster, R. L., Huang, C., 2003. Concept Analysis of Pain. *Tzu Chi Nursing Journal* 2, 20-29.
- Cho, W. G., Valtschanoff, J. G., 2008. Vanilloid receptor TRPV1-positive sensory afferents in the mouse ankle and knee joints. *Brain Research* 1219, 59-65.
- Chuang, Y. C., Yoshimura, N., Wu, M., Huang, C. C., Chiang, P. H., Tyagi, P., Chancellor, M. B., 2007. Intraprostatic capsaicin injection as a novel model for nonbacterial prostatitis and effects of botulinum toxin A. *European urology* 51, 1119-1127.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C. J., 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience* 32, 1.
- Crisp, T., Minus, T. O., Coleman, M. L., Giles, J. R., Cibula, C., Finnerty, E. P., 2006. Aging, peripheral nerve injury and nociception: effects of the antioxidant 16-desmethyltirilazad. *Behavioural brain research* 166, 159-165.
- Doré, S., 2005. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* 14, 61-70.

- Dugan, L., Choi, D., 1999. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 711-729.
- Entrena, J. M., Cobos, E. J., Nieto, F. R., Cendán, C. M., Baeyens, J. M., Del Pozo, E., 2009. Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacology* 205, 21-33.
- Fein, A., 2009. Nociceptors: the cells that sense pain. *Nociceptors*.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of experimental biology* 201, 1203.
- Gabbita, S. P., Robinson, K. A., Stewart, C. A., Floyd, R. A., Hensley, K., 2000. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 376, 1.
- Gandolfi, E., Andrade, M. G. G., 2006. Eventos toxicológicos relacionados a medicamentos no Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 40, 1056-1064.
- Gentili, M., Mazoit, J. X., Bouaziz, H., Fletcher, D., Casper, R. F., Benhamou, D., Savouret, J. F., 2001. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life sciences* 68, 1317-1321.
- Gilron, I., Watson, C. P. N., Cahill, C. M., Moulin, D. E., 2006. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *Canadian Medical Association Journal* 175, 265.
- Guitart, X., Codony, X., Monroy, X., 2004. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology* 174, 301-319.
- Gupta, Y. K., Sharma, M., Briyal, S., 2004. Antinociceptive effect of trans-resveratrol in rats: Involvement of an opioidergic mechanism. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26, 667-672.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford.

Hathway, G. J., Vega-Avelaira, D., Moss, A., Ingram, R., Fitzgerald, M., 2009. Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates. *Pain* 144, 110-118.

Katanosaka, K., Banik, R. K., Giron, R., Higashi, T., Tominaga, M., Mizumura, K., 2008. Contribution of TRPV1 to the bradykinin-evoked nociceptive behavior and excitation of cutaneous sensory neurons. *Neuroscience research* 62, 168-175.

Kawano, D. F., Pereira, L. R. L., Ueta, J. M., Freitas, O., 2006. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los? *Rev Bras Ciênc Farm* 42.

Khalil, Z., Khodr, B., 2001. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 430-439.

Khalil, Z., Liu, T., Helme, R. D., 1999. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain* 79, 31-37.

Kim, H. K., Park, S. K., Zhou, J. L., Taglialatela, G., Chung, K., Coggeshall, R. E., Chung, J. M., 2004. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111, 116-124.

Komatsu, T., Sasaki, M., Sanai, K., Kuwahata, H., Sakurada, C., Tsuzuki, M., Iwata, Y., Sakurada, S., Sakurada, T., 2009. Intrathecal substance P augments morphine-induced antinociception: Possible relevance in the production of substance P N-terminal fragments. *Peptides* 30, 1689-1696.

Lappin, S. C., Randall, A. D., Gunthorpe, M. J., Morisset, V., 2006. TRPV1 antagonist, SB-366791, inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation. *Eur J Pharmacol* 540, 73-81.

Lee, I., Kim, H. K., Kim, J. H., Chung, K., Chung, J. M., 2007. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *Pain* 133, 9-17.

Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B. H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., Shi, X., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced

cellular responses. *Biochemical and biophysical research communications* 309, 1017-1026.

Lopez-Velez, M., Martinez-Martinez, F., Del Valle-Ribes, C., 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical reviews in food science and nutrition* 43, 233-244.

Mahmud, S. D. P., Martinbiancho, J. K., Zuckermann, J., Jacoby, T. S., dos Santos, L., da Silva, D., 2006. *Assistência Farmacêutica: Ações de apoio à qualidade assistencial*

Malcangio, M., Lessmann, V., 2003. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends in pharmacological sciences* 24, 116-121.

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

Millan, M. J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology* 57, 1-164.

Mokni, M., Elkahoui, S., Limam, F., Amri, M., Aouani, E., 2007. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochemical Research* 32, 981-987.

Naik, A. K., Tandan, S. K., Dudhgaonkar, S. P., Jadhav, S. H., Kataria, M., Prakash, V. R., Kumar, D., 2006. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain* 10, 573-579.

Pérez-Severiano, F., Bermúdez-Ocaña, D. Y., López-Sánchez, P., Ríos, C., Granados-Soto, V., 2008. Spinal nerve ligation reduces nitric oxide synthase activity and expression: Effect of resveratrol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90, 742-747.

Peters, J. H., McDougall, S. J., Fawley, J. A., Smith, S. M., Andresen, M. C., 2010. Primary afferent activation of thermosensitive TRPV1 triggers asynchronous glutamate release at central neurons. *Neuron* 65, 657-669.

Prado, P. T. C., Del Bel, E. A., 1998. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção; C-fos, an immediate early gene as a neuromarker for nociception. *Medicina (Ribeirão Preto)* 31, 424-433.

Ribeiro, S., Schmidt, A. P., Schmidt, S. R. G., 2002. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. *Rev Bras Anesthesiol* 52, 644-651.

Santos, V., Nitrini, S. M., 2004. Indicadores do uso de medicamentos prescritos e de assistência ao paciente de serviços de saúde. *Revista de Saúde Pública* 38, 819-834.

Sharma, S., Chopra, K., Kulkarni, S. K., 2007a. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytother Res* 21, 278-283.

Sharma, S., Kulkarni, S. K., Chopra, K., 2007b. Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Fundamental & clinical pharmacology* 21, 89-94.

Vetter, G., Geisslinger, G., Tegeder, I., 2001. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92, 213-218.

Viggiano, A., Monda, M., Viggiano, D., Viggiano, E., Chiefari, M., Aurilio, C., De Luca, B., 2005. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Research* 1050, 72-78.

Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Rottinghaus, G., Sun, G. Y., Sun, A. Y., 2004. Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochemical Research* 29, 2105-2112.

Warner, D. S., Sheng, H., Batini -Haberle, I., 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *Journal of experimental biology* 207, 3221.

Watkins, L. R., Milligan, E. D., Maier, S. F., 2001. Glial activation: a driving force for pathological pain. *TRENDS in Neurosciences* 24, 450-455.

Xu, L., Mabuchi, T., Katano, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Sakimura, K., Mishina, M., Ito, S., 2007. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to

activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide* 17, 18-24.

Zhang, X., Wu, J., Lei, Y., Fang, L., Willis, W. D., 2005. Protein phosphatase modulates the phosphorylation of spinal cord NMDA receptors in rats following intradermal injection of capsaicin. *Molecular brain research* 138, 264-272.

Zhuo, M., 2007. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Molecular pain* 3, 14.