



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

PATRIK SAUL ZARPELLON BARBOSA

EFEITO DE TERPENÓIDES NA CORRENTE DE SÓDIO DE CANAIS $\text{Na}_v 1.7$ E
CITOTOXICIDADE

JOÃO PESSOA

2019

PATRIK SAUL ZARPELLON BARBOSA

**EFEITO DE TERPENÓIDES NA CORRENTE DE SÓDIO DE CANAIS $\text{Na}_v 1.7$ E
CITOTOXICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo.

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B238e Barbosa, Patrik Saul Zarpellon.
EFEITO DE TERPENÓIDES NA CORRENTE DE SÓDIO DE CANAIS
Nav 1.7 E CITOTOXICIDADE / Patrik Saul Zarpellon
Barbosa. - João Pessoa, 2019.
51 f. : il.

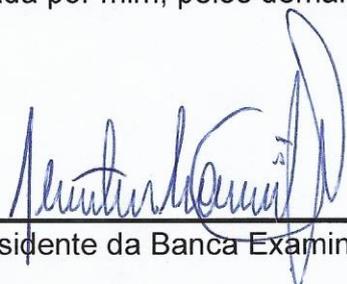
Orientação: Demetrius Antonio Machado de Araújo.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Limoneno. 2. Bisabolol. 3. Carvona. 4. Carveol. I.
de Araújo, Demetrius Antonio Machado. II. Título.

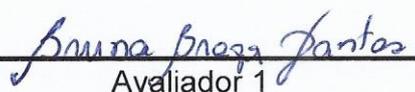
UFPB/BC

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

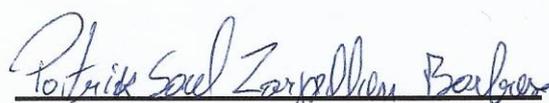
Aos dezoito dias do mês de setembro de 2019, às 08:00h, em sessão pública na sala DQ-05 do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Bruna Braga Dantas (BS/UAS/UFCG); 2. Juan Carlos Ramos Gonçalves (DCF/CCS/UFPB), o discente Patrik Saul Zarpellon Barbosa, matrícula 11505809, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“EFEITO DE TERPENÓIDES NA CORRENTE DE SÓDIO DE CANAIS Nav 1.7 E CITOTOXICIDADE”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Demetrius Antônio Machado de Araújo, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.



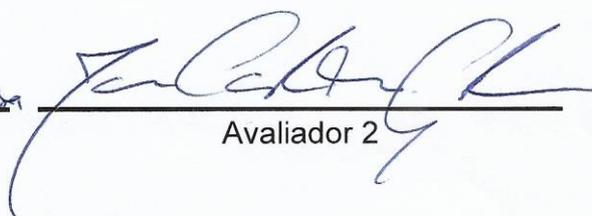
Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 19 de setembro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus quatro melhores amigos: futura doutora Mirna Zarpellon, Dr^a. Paulla Iadia, Dr Pablo Lennon e ao “Caboco” Sandoval Barbosa. Dedico especialmente aos meus avós Saul Nelson Zarpellon e Edviges Elza Zarpellon, bem como a meu avós paternos “Vaqueiro Santuca” Raimundo Mateus Barbosa e dona Maria Madalena Barbosa. Aos meus amigos de infância e adolescência, aos meus amigos de graduação e a sociedade que merece um retorno, em especial à Ponta de Pedras - Ilha do Marajó – Pará, e também ao Estado da Paraíba.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em posição das únicas exceções técnicas nos agradecimentos, a Deus pela existência, permitindo que eu conhecesse tudo que já vi e permitindo que chegasse até esse momento, aos meus pais Mirna Cirte Zarpellon e Raimundo Sandoval Amoedo Barbosa por toda a criação e educação que me deram, pois eu não trocaria isso por nenhuma outra educação, bem como aos meus avós maternos Saul Nelson Zarpellon e Edviges Elza Zarpellon, e aos avós paternos Raimundo Mateus Barbosa e Maria Madalena Amoedo Barbosa por tudo.

Agradeço à doutoranda Aliny Vasconcelos por todo o treinamento na técnica de Patch Clamp, agradeço pela companhia em laboratório e por ser um dos pilares desse TCC.

Agradeço aos amigos e companheiros de laboratório Lucas Lima, Matheus Fabião e Brena Heloiza por todo conhecimento trocado, e que veio a auxiliar neste trabalho, agradeço a companhia e ideias trocadas fora e dentro do lab. E acima disso, obrigado por participarem dessa etapa que foi a graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Wagner Faustino de Mendonça pela amizade, pelos ensinamentos e diversas áreas, pelos momentos filosóficos e por acompanhar de perto todo o desenrolar dos nossos TCCs. Ainda penso que a carga de informação trocada só vai crescer a partir de agora, rumo à próxima etapa, ao som das Bachianas Brasileiras e de um bom Jazz, tomando – é claro – aquele bom café.

Agradeço aqueles que ajudaram de forma mais sutil nesse trabalho, em especial os graduando Mateus Da Silva Matias Antunes e Bianca Teixeira, bem como o Biotecnologista mestrando Mickael Sousa, também agradeço a vocês essa grande amizade que surgiu.

Agradeço também, ao Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos e à Prof. Dr. Mirian Stiebbe Salvadori e às respectivas equipes de laboratório, pois foram essenciais na minha formação como cientista, principalmente no tempo em que estagiei no Laboratório de Microbiologia Ambiental e no Laboratório de Psicofarmacologia, respectivamente.

De forma mais geral, mas ainda sim no âmbito técnico, agradeço a todos os professores do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (Campus I), pela excelente formação, por serem extremamente dedicados e atenciosos com vossos alunos e amigos.

Agradeço ao CBiotec e ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular pela infraestrutura na qual fui moldado para a pesquisa científica, e também pelos demais que contribuíram com esse trabalho como o Prof. Dr. Samuel Cibulski, que nesse último semestre

de graduação, deu contribuições essenciais à minha formação. E também a futura doutora Renata Almeida, que sempre auxiliou nos meus experimentos, cedendo materiais indispensáveis aos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo por me aceitar no LBCM – Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, por ensinar de forma diferenciada e verdadeira. Agradeço à Prof^a. Dr^a Bruna Braga Dantas por todos os ensinamentos valiosos e por aceitar compor a banca do meu TCC. Agradeço também ao Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves e ao Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes por aceitarem compor a banca sem hesitar e nem por dificuldades.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro das agências de fomento CAPES e do CNPq.

“Mas você só tem que olhar para a milésima parte de uma polegada através de um bom microscópio, o que amplia, por exemplo, mil vezes, cada partícula aparecerá tão grande como uma polegada a olho nu, e você será convencido da possibilidade de dividir cada uma dessas partículas novamente em mil partes: o mesmo raciocínio pode ser sempre levado avante sem limite e sem fim. “

Leonhard Euler

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton

RESUMO

Os terpenóides são compostos conhecidos por diversas aplicações, entre elas as terapêuticas, sendo muitas dessas evidências relacionada a canais iônicos, como os canais Na_v . Os Na_v são os encarregados por iniciar os potenciais de ação em células excitáveis, incluindo neurônios nociceptores ganglionares da raiz dorsal (DRG), um dos responsáveis pela sensação de dor. Os canais Na_v representa uma família inteira de canais, que é composta por novo subtipos: de Na_v 1.1 a Na_v 1.9, sendo os Na_v 1.7 a Na_v 1.9 os mais expressos em neurônios DRG. Os terpenóides S-(+)-carvona, (-)-carveol, R-(+)-limoneno e α -bisabolol foram usados para os experimentos de *patch-clamp* nas células CHO-h Na_v 1.7 (concentração de 500 μM e para a citotoxicidade em células CHO-h Na_v 1.7 e SH-SY5Y (concentração de 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 μM). Os registros eletrofisiológicos de correntes de Na_v 1.7 foram obtidos por meio da técnica de *patch-clamp* no modo *voltage-clamp* na configuração *whole-cell* na linhagem CHO-h Na_v 1.7. Para isso, foi utilizado o seguinte protocolo: potencial de *holding* em -90 mV seguido de um pulso teste de -120 mV para 0 mV durante 200 ms. E para o ensaio de citotoxicidade, as células foram plaqueadas com 3×10^4 células por poço, foram tratadas com terpenóides por 24h, depois foi adicionado MTT e após 4h as placas foram centrifugadas, o sobrenadando foi descartado e então adicionou-se DMSO, a leitura das placas foi em espectrofotômetros a 570 nm. Os valores de densidade de corrente de Na_v 1.7 na situação controle e na presença dos terpenóides foram respectivamente: S-(+)-carvona $-21,75 \pm 2,95$ A/F para $-17,82 \pm 1,55$ A/F, correspondendo a uma inibição de 18,07%; (-)-carveol, $-47,46 \pm 10,76$ A/F para $-46,23 \pm 8,62$ A/F, taxa de inibição de 2,59%; R-(+)-limonene $-23,45 \pm 2,41$ A/F para $-14,87 \pm 2,41$ A/F, taxa de inibição de 36.6% e finalmente, α -bisabolol $-13,71 \pm 2,41$ A/F para $-4,18 \pm 0,62$ A/F, com uma taxa de inibição de 69.5%. Já as CI_{50} nas células SH-SY5Y e CHO-h Na_v 1.7 – em μM – foram respectivamente: 5577 \pm 1,06 e 3876 para o R-(+)-limoneno, 2190 \pm 1,16 e 2497 \pm 1,06 para a S-(+)-carvona, 1205 \pm 1,14 e 1495 \pm 1,08 para o (-)-carveol, e por fim 1002 \pm 1,10 e 1730 \pm 1,03 para o α -bisabolol. Dos terpenóides, apenas o R-(+)-limoneno e o α -bisabolol inibiram as correntes de sódio em células CHO-h Na_v 1.7. E essa modulação não foi influenciada pela citotoxicidade dos terpenóides, uma vez que a concentração de 500 μM usada no *patch-clamp* não foi citotóxica para as células CHO-h Na_v 1.7. Além disso, de forma geral, os quatro terpenóide apresentaram citotoxicidade muito baixa, sendo todas as CI_{50} acima de 1000 μM .

Palavras-chave: Limoneno. Bisabolol. Carvona. Carveol.

ABSTRACT

Terpenoids are compounds known for several applications, including therapeutics, and many of these evidences are related to ion channels, such as Nav channels. Nav are responsible for initiating action potentials in excitable cells, including dorsal root ganglion nociceptor neurons (DRG), one of those responsible for the sensation of pain. Nav channels represent an entire family of channels, which is composed of new subtypes: from Nav 1.1 to Nav 1.9, with Nav 1.7 to Nav 1.9 being the most expressed in DRG neurons. The terpenoids S-(+)-carvone, (-)-carveol, R-(+)-limonene and α -bisabolol were used for the CHO-hNav 1.7 cell patch-clamp experiments (500 μ M concentration and CHO-hNav 1.7 and SH-SY5Y cells (concentration of 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 μ M). The electrophysiological recordings of Nav 1.7 currents were obtained by the patch-clamp technique in the voltage-clamp mode in the whole-cell configuration in CHO-hNav 1.7 lineage. The following protocol was used: holding potential at -90 mV followed by a test pulse of -120 mV to 0 mV for 200 ms. In the cytotoxicity assay, cells were plated at 3×10^4 cells per well, treated with terpenoids for 24h, then MTT was added and after 4h the plates were centrifuged, the supernatant was discarded and then DMSO was added, the plates were read in spectrophotometers at 570 nm. Nav 1.7 current density values in control and presence of terpenoids were respectively: S-(+)-carvone -21.75 ± 2.95 A/F to -17.82 ± 1.55 A/F, corresponding to an inhibition of 18.07% ; (-)-carveol, -47.46 ± 10.76 A/F to -46.23 ± 8.62 A/F, inhibition rate of 2.59%; R-(+)-limonene - $23,45 \pm 2,41$ A/F to $-14,87 \pm 2,41$ A/F, inhibition rate 36.6% and finally α -bisabolol $-13,71 \pm 2,41$ A/F to $-4,18 \pm 0,62$ A/F, with an inhibition rate of 69.5%. The CI_{50} in SH-SY5Y and CHO-hNav 1.7 cells - in μ M - were respectively: 5577 \pm 1.06 and 3876 for R-(+)-limonene, 2190 \pm 1.16 and 2497 \pm 1.06 for S-(+)-carvone, 1205 \pm 1.14 and 1495 \pm 1.08 for (-)-carveol, and finally 1002 \pm 1.10 and 1730 \pm 1.03 for α -bisabolol. Only R-(+)-limonene and α -bisabolol inhibited sodium currents in CHO-hNav 1.7 cells, this modulation was not influenced by terpenoid cytotoxicity, since the 500 μ M concentration used in the patch-clamp was not cytotoxic to CHO-hNav 1.7 cells. In addition, all four terpenoids generally had very low cytotoxicity, all CI_{50} being above 1000 μ M.

KEY-WORDS: Limonene. Bisabolol. Carvone. Carveol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Potencial de ação e as suas fases, com a participação dos canais Na_v e K_v	18
Figura 2-	Representação da superfamília dos canais iônicos dependentes de voltagem.....	19
Figura 3-	Estrutura da subunidade α dos canais Na_v e as subunidades auxiliares β_2 e β_1	20
Figura 4-	Esquema de transmissão de um estímulo do SNP até o SNC.....	23
Figura 5-	Estrutura do isopreno e do derivado monoterpeneo limoneno.....	24
Figura 6-	Estrutura de alguns terpenóides.....	25
Figura 7-	Esquema das configurações da técnica de <i>patch-clamp</i>	26
Figura 8-	Efeito da S-(+)-carvona nas correntes totais do Na_v 1.7 em células CHO-h Na_v 1.7.....	33
Figura 9-	Efeito do (-)-carveol nas correntes totais do Na_v 1.7 em células CHO-h Na_v 1.7.....	34
Figura 10-	Efeito do R-(+)-limoneno nas correntes totais do Na_v 1.7 em células CHO-h Na_v 1.7.....	34
Figura 11-	Efeito do α -bisabolol nas correntes totais do Na_v 1.7 em células CHO-h Na_v 1.7.....	35
Figura 12-	Citotoxicidade do R-(+)-limoneno em células CHO-h Na_v 1.7 e SH-SY5Y.....	37
Figura 13-	Citotoxicidade do S-(+)-carvona em células CHO-h Na_v 1.7 e SH-SY5Y.....	38
Figura 14-	Citotoxicidade do (-)-carveol em células CHO-h Na_v 1.7 e SH-SY5Y.....	39
Figura 15-	Citotoxicidade do α -bisabolol em células CHO-h Na_v 1.7 e SH-SY5Y.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores de densidade de corrente e as respectivas percentagens de inibição pelos diferentes terpenóides.....	36
Tabela 2-	Valores das CI_{50} dos terpenóides em células CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	anestésico local
Ca_v	canais de íons cálcio dependentes de voltagem
CNG	canais ativados por nucleotídeo cíclico
DMEM	meio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DRG	gânglios da raiz dorsal
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GABA	ácido gama aminobutírico
GPCR	receptores acoplados às proteínas G
HCN	canais ativados por hiperpolarização dependentes de nucleotídeo cíclico
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
Na_v	canais de sódio dependentes de voltagem
NMDA	N-metil-D-aspartato
OE	óleo essencial
PA	potencial de ação
PAC	potencial de ação composto
SBF	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SNS	sistema nervoso somatossensorial
TRP	canais receptores de potencial-transiente
TRP	receptor de potencial transitório
TTX	tetrodotoxina
VGSC	canais de sódio dependentes de voltagem
CI₅₀	concentração inibitória de 50%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 A EXCITABILIDADE NEURONAL E O POTENCIAL DE AÇÃO	17
2.1.1 Canais iônicos voltagem-dependentes	18
2.1.2 Canais Nav: subtipo $Na_v 1.7$	20
2.1.3 Neurônios do gânglio da raiz dorsal (neurônios DRG)	21
2.2 FUNDAMENTOS DA DOR	21
2.2.1 Classificação geral	21
2.2.2 Transmissão da dor e nocicepção	22
2.4 PRODUTOS NATURAIS: A ESTRATÉGIA DOS TERPENÓIDES	24
2.4.1 Óleos essenciais e sua constituição	24
2.4.2 Terpenóides	24
2.5 TÉCNICA DE PATCH-CLAMP	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 SOLUÇÕES E SUBSTÂNCIAS	29
4.1.1 Diluições dos derivados terpenóides	29
4.1.2 Soluções para os experimentos de patch-clamp	29
4.1.3 Soluções para cultivo celular	29
4.1.4 Soluções e substâncias para experimento de citotoxicidade	30
4.2 CULTURA CELULARES	30
4.3 PATCH-CLAMP	30
4.4 CITOTOXICIDADE: MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT	31
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4.5.1 Análise da citotoxicidade	32
4.5.2 Análise do patch-clamp	32
5 RESULTADOS	33
5.1 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE PATCH-CLAMP	33
5.2 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE	36
6 DISCUSSÃO	41

7 CONCLUSÃO.....	44
8 PERSPECTIVAS.....	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Por mais dolorosa que seja uma sensação, muitas coisas dependem da sensação de dor: nossas relações interpessoais, a forma que nós nos comportamos em uma sociedade, entre outras percepções essenciais à vida. Além disso, essa sensação é importante para nosso bem-estar, uma vez que agentes nocivos ao nosso corpo são acusados pela dor. Mas as sensações dolorosas se revelam problemáticas quando persistem, e então essa sensação se mostra como um incômodo improvável de ser aliviado, tendo como exemplo a dor crônica. Não sendo mais vista como uma sensação auxiliar ao nosso bem, a dor se torna uma sensação indesejada (VERVOORT et al., 2016).

A dor ainda é um problema negligenciado, no que concerne às implicações sociais e psicológicas (STANOS et al., 2016). Mas na expectativa de resolver a problemática da dor, muitas pesquisas surgem na busca de alternativas terapêuticas, e dentro desse conjunto há diversos elementos como os antagonistas NMDA, opioides, drogas antiepilépticas, bloqueadores de canais de cálcio, ativadores de canais de potássio e moduladores de canais de sódio (CHONG et al., 2006; WORLEY, 2016).

Os canais iônicos são proteínas transmembranares que regulam a passagem de cargas elétricas através da membrana plasmática, e isso se relaciona com a funcionalidade de transmissão de muitas informações. São essenciais para diversas funções, tais como: excitabilidade muscular, transmissão de informações no tecido nervoso, secreção de hormônios, entre outras. Por isso, esses canais são alvos farmacológicos visados pela ciência, no intuito de intervir em doenças (OZ et al., 2015).

Entre os canais iônicos, os canais de sódio dependentes de voltagem (*voltage-gated sodium channels* - VGSCs) estão entre os principais canais para o estudo de patologias como a dor crônica. Sendo que é graças aos VGSCs que há a despolarização inicial da membrana celular, levando ao desencadear dos potenciais de ação. Sendo os potenciais de ação os responsáveis pela transmissão do estímulo doloroso, os VGSCs são portanto, essenciais para que qualquer pessoa possa ter o sentimento de dor, logo, esses canais de sódio são alvos terapêuticos para o tratamento de dores crônicas (OZ et al. 2015; COSTIGAN et al., 2009).

Os VGSCs representam uma família de nove canais em mamíferos: Na_v 1.1 a Na_v 1.9, expressos em diferentes tecidos (CATTERALL, 2012). Entre esses subtipos, o Na_v 1.7 é um alvo farmacológico promissor para o tratamento da dor, uma vez que mutações no gene responsável pela expressão do canal levam pacientes a terem insensibilidade à dor ou a sofrer excessivas dores (CHERNOV-ROGAN et al., 2018; DEUIS et al., 2017).

Muitas drogas exercem seus efeitos terapêuticos atuando nos canais iônicos de vários tecidos. No contexto da busca por novos agentes farmacológicos, os óleos essenciais (OEs) foram recentemente investigados em vários estudos para validar sua atividade em vários canais iônicos. Os OEs apresentam diversos efeitos terapêuticos, entre eles estão efeitos relacionados à dor: analgesia e efeito antinociceptivos por exemplo. Sendo que, muito desses efeitos acabam por serem atribuído aos derivados terpenóides (monoterpenos por exemplo), já que esses são um dos principais componentes dos OEs (WANG et al., 2018).

Por corolário, a investigação do efeito desses compostos terpenóides sobre a corrente de sódio de canais Na_v 1.7 é de importância científica, já que existe a relação entre a dor, o subtipo de canais Na_v 1.7 e os derivados de terpenos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

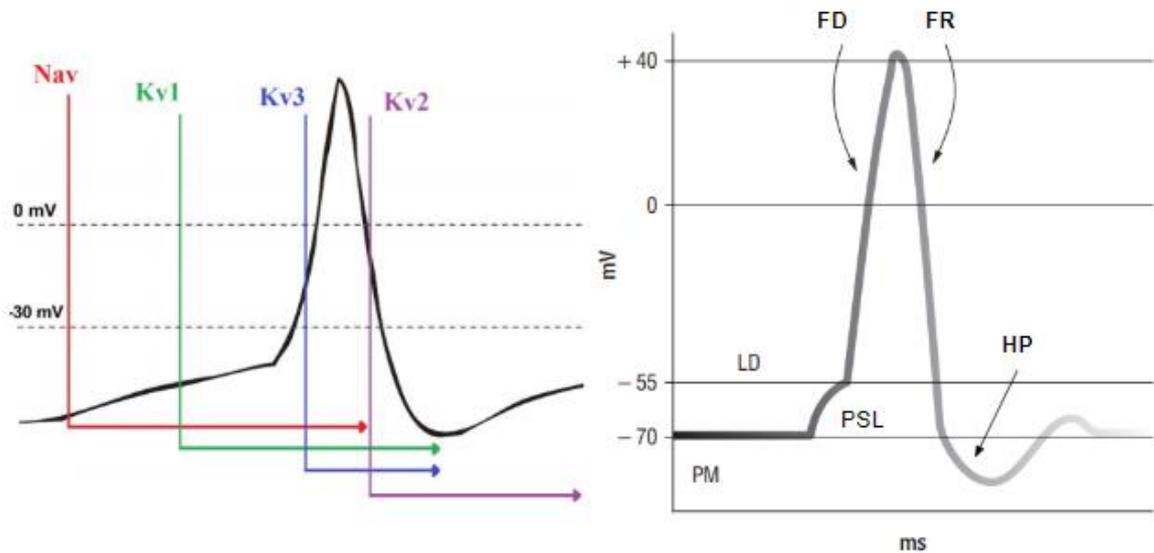
2.1 A excitabilidade neuronal e o potencial de ação

A transmissão e interpretação de informações pelo sistema nervoso é indispensável à sobrevivência, efetivando-se na comunicação entre os neurônios e as células efectoras de órgãos. Toda essa história de evidências empíricas e experimentais, mostraram que essas complexas comunicações entre células são de natureza eletroquímica, com a presença de um componente intracelular e intercelular: o primeiro sendo representado pela natureza elétrica dos impulsos nervosos, e o segundo como natureza química (neurotransmissores) (DRUKARCH et al., 2018).

Para que essas complexas funções possam existir, células nervosas se comunicam via projeções denominadas dendritos e axônios, as quais possuem a função primordial de conduzir o impulso nervoso (potencial de ação). E para que essa condução aconteça, canais iônicos são indispensáveis: destacando-se os canais dependentes de voltagem para íons sódio (Na_v) e para íons potássio (K_v), os dois principais componentes, sendo o Na_v responsável por iniciar o potencial de ação. Além disso, bloqueando os canais de sódio, ou diminuindo o gradiente de íons Na^+ , a condução do impulso é impedida (DEBANNE et al., 2013).

A Figura 1 representa a ação dos Na_v e K_v em momentos diferentes, sendo que diferentes subtipos de K_v são ativados durante o potencial de ação, devido propriedades biofísicas desses canais e também à cinética deles. O K_v1 é ativado mais cedo no PA, influenciando no limiar de disparo dos PAs, o canal K_v2 tem uma cinética mais lenta, interferindo na forma dos potenciais quando disparados em seguida. Já o K_v3 é ativado depois do K_v1 , atribuindo-se ao K_v3 a formação potencial na fase de repolarização em relação a despolarização, alterando o formato do pico (HOWARD, 2016).

Figura 1: Potencial de ação e as suas fases, com a participação dos canais Na_v e K_v



Fonte: adaptado de HOWARD, 2016 e KRUEGER-BECK et al., 2011.

A esquerda o esquema de um potencial de ação e os momentos específicos da participação do canal Na_v e dos diferentes canais K_v indicado pelas setas coloridas: vermelha (Na_v), verde (K_v1), azul (K_v3) e seta roxa (K_v2). A direita, o esquema do potencial de ação em uma célula e as fases que o compõem, estando a voltagem (mV) em função do tempo (ms). Estão indicados os seguintes elementos no gráfico: PM (potencial de membrana), LD (limiar de despolarização), PSL (potencial sub limiars), FD (fase de despolarização), FR (fase de repolarização) e HP (hiperpolarização).

Para que o potencial de ação (PA) aconteça uma ação conjunta entre os Na_v e os canais K_v é necessária, lembrando que é a corrente de íons Na^+ que iniciam o PA. Inicialmente, após o estímulo nervoso, os canais Na_v se aumentando a condutância de íons Na^+ para o meio intracelular (MIC), dando início então à fase de despolarização da membrana celular até atingir um potencial de membrana entre 0 mV e 40 mV (Figura 1). Já na repolarização, os canais Na_v já estão sendo inativados e simultaneamente os canais K_v abrem, diminuindo-se a entrada de Na^+ e aumentando a saída de K^+ para o meio extracelular (MEC), isso também é atribuído aos gradientes de concentração de cada íon: a exemplo do que se observar em neurônios gigantes de lula 50 mM de Na^+ (MIC) e 440 mM (MEC), enquanto que para o K^+ os valores são 400 mM (MIC) e 20 mM (MEC) (DEBANNE et al., 2013; KRUEGER-BECK et al., 2011).

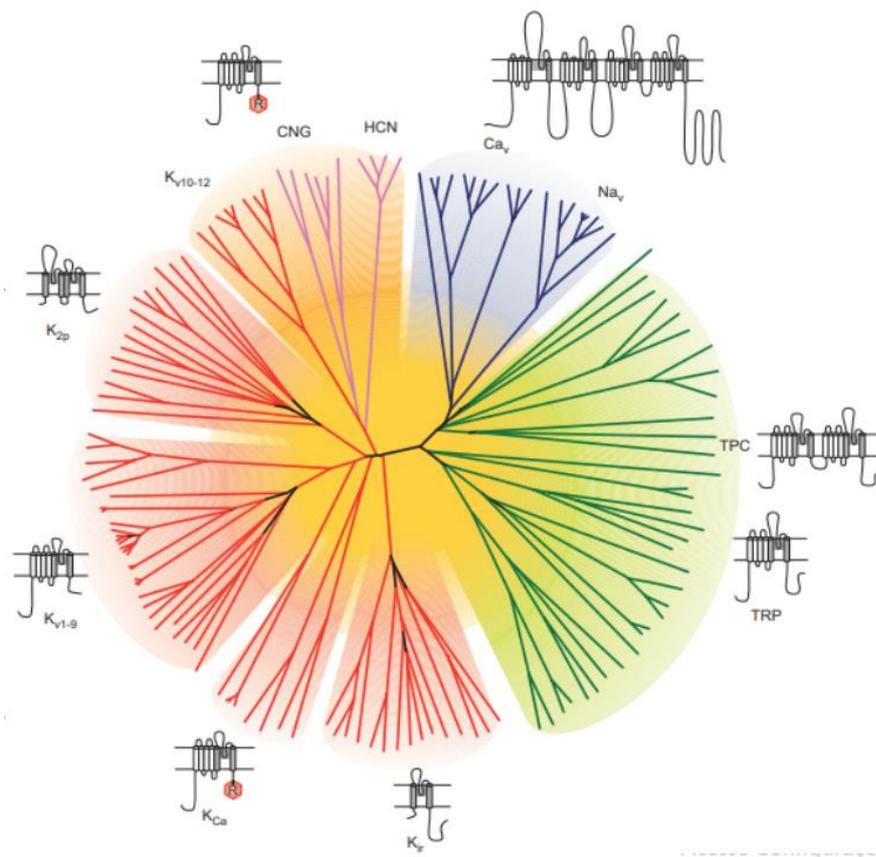
2.1.1 Canais iônicos voltagem-dependentes

Muitos fenômenos biológicos, essenciais para a manutenção da vida, dependem de proteínas pertencentes à grande família dos canais iônicos dependentes de voltagem. Entre

essas funções estão: liberação de hormônios, contração muscular, modulação de expressão gênica, processamento de informações, entre outras (FRANK et al., 2004).

Essa família de proteínas corresponde 143 membros (Figura 2), representando uma variedade de canais seletivos e não seletivos: canais para íons Ca^+ , para íons Na^+ , para K^+ , canais para cátions como os TRPs (canais receptores de potencial transiente) e CNG (canais modulados por nucleotídeos cíclicos). Toda essa variedade representa um dos maiores grupos, em número, responsável por transdução de sinais, ficando atrás apenas dos receptores acoplados à proteína G e das proteínas quinases. Há ainda subgrupos de canais, entre esses grupos estão os grandes subgrupos dos TRPs, os canais de potássio e também os Na_v , como exemplo temos os Na_v , que corresponde à nove canais $\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$ (FRANK et al., 2004).

Figura 2: Representação da superfamília dos canais iônicos dependentes de voltagem



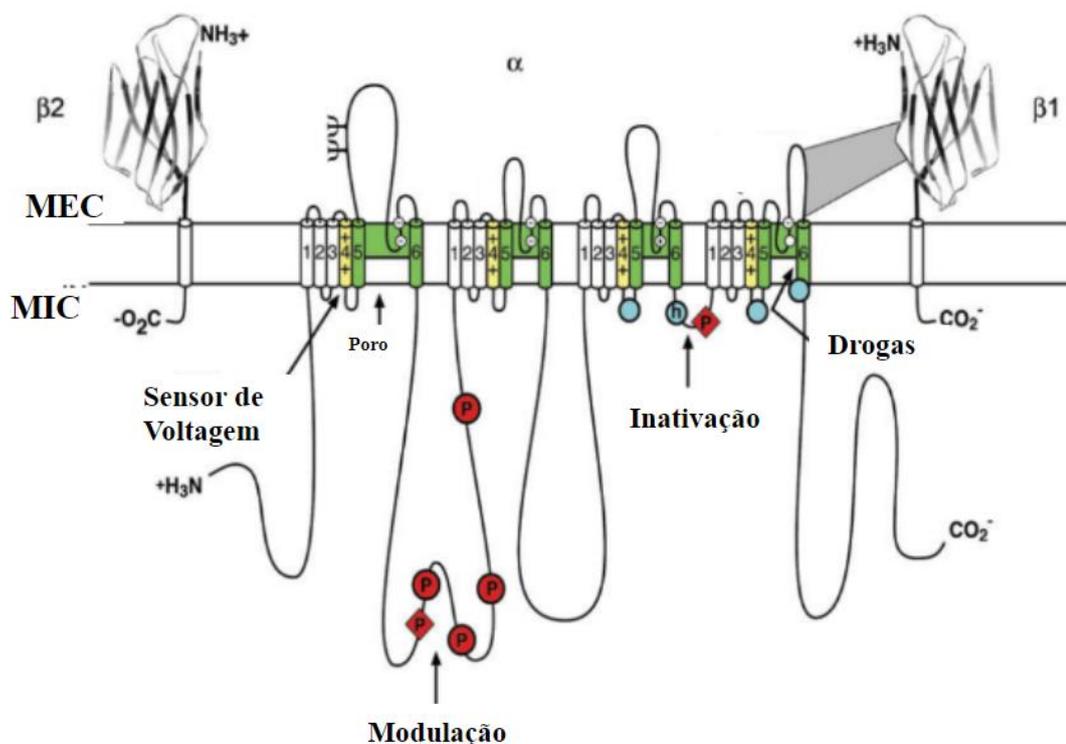
Fonte: adaptado de FRANK et al., 2004.

O diagrama acima representa 143 membros dessa grande família de canais, sendo relacionados entre si com base na identidade de aminoácidos. Os canais estão indicados por traços de cores diferentes: canais de quatro domínios repetidos indicados por traços em azul (Na_v e Ca_v); K_v (traços vermelhos), CNG e HCN (canais ativados por nucleotídeos cíclicos - traços lilás); os TRP (canais receptores de potencial-transiente - traços verdes).

2.1.2 Canais Na_v : subtipo $Na_v 1.7$

Os canais da família Na_v são fundamentais para a transmissão de informações como as sensações dolorosas, uma vez que estes estão envolvidos com a gênese dos potenciais de ação. Os canais Na_v são formados por 24 segmentos transmembranares, sendo quatro domínios (DI a DIV) com 6 segmentos cada um (de S1 a S6), formando-se a subunidade α do canal Na_v . Além disso, a canal ainda é regulado via interação com suas subunidade β (Figura 3) (DIB-HAJJ et al., 2019).

Figura 3: Estrutura da subunidade α dos canais Na_v e as subunidades auxiliares $\beta 2$ e $\beta 1$



Fonte: adaptado de CATTERALL, 2012.

Estrutura do canal Na_v , com as subunidades β auxiliares em ambos lados da grande subunidade α . Está representado as extremidades N terminal e C terminal das subunidades do canal, são também mostrados os sítios de modulação do canal, bem como o sítio de inativação e os segmentos de S1 a S6 de cada domínio, sendo o segmento 4 indicado como o sensor de voltagem do canal. Além disso, há indicado outros sítios onde drogas podem atuar, e no domínio mais próximo da extremidade N terminal da subunidade α , está indicado onde se forma o poro do canal. MIC (meio intracelular) e MEC (meio extracelular).

A subunidade α é expressa por 10 genes diferentes, essa expressão se dá em tecidos diversos do corpo. Portanto, podemos dizer que existem 10 subtipos de canais de sódio: $Na_v 1.1$ a $Na_v 1.9$, e o Na_x encontrado no útero, em astrócitos e no tecido hipocampal, porém esse não é um Na_v , e está relacionado à sensibilidade a sal. Os canais $Na_v 1.1$, $Na_v 1.2$, $Na_v 1.3$ e o

Na_v 1.6 são canais presentes no SNC, já o Na_v 1.4 é encontrado nos músculos esqueléticos, enquanto que o Na_v 1.5 está presente no tecido cardíaco. Por fim, os canais Na_v 1.7, Na_v 1.8 e Na_v 1.9 são expressos no SNP, estando – portanto – presentes em neurônios DRG (CATTERALL, 2012) o que os torna alvo terapêutico para dor (CHONG et al., 2006).

2.1.3 Neurônios do gânglio da raiz dorsal (neurônios DRG)

A excitabilidade dos nervos periféricos é dependente da ativação dos canais Na_v, em especial os Na_v 1.7, Na_v 1.8 e Na_v 1.9. Esses canais podem ser divididos em resistentes à tetrodotoxina (TTX) ou TTX-R, e sensíveis à TTX ou TTX-S: os canais Na_v 1.8 e Na_v 1.9 são do grupo TTX-R, enquanto que o Na_v 1.7 é um canal TTX-S (CATTERALL, 2012; DIB-HAJJ et al., 1999). As células que compõem esses nervos, e que captam o estímulo nervoso são os neurônios DRG, mas geralmente são os neurônios de menor diâmetro os responsáveis por transmitir a informação dolorosa, portanto, chamados de neurônios nociceptores (RENGANATHAN et al., 2001; DIB-HAJJ et al., 1999).

No intuito de estudar os DRG, incluindo modelos alternativos que não o próprio DRG em cultura primária por exemplo, modelos de células em cultura imortalizadas vem sendo usados nos últimos anos: a exemplo as linhagens ND7/23, F-11 e a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Todas essas linhagens - com base na expressão de RNA de marcadores específicos em relação aos neurônios DRG - apresentam limitações, mas também potenciais para serem modelos (YIN et al., 2016).

2.2 Fundamentos da dor

2.2.1 Classificação geral

A dor é entendida como uma experiência sensorial e emocional associada a potenciais ou reais danos teciduais (COSTIGAN et al., 2009). A dor pode ser aguda ou crônica, a dor aguda é caracterizada por um tempo de duração menor que 3 meses, e é entendida como uma função importante para a proteção do indivíduo contra possíveis traumas, ou injúrias de fato sofridas. Já a dor crônica, é uma sensação que perdura por mais tempo, tornando-se um incômodo e que pode se apresentar sem uma causa evidentemente relacionada a um dano, bem como é entendida - historicamente - como uma patologia periférica (STANOS et al., 2016).

A dor é classificada em quatro grupos: dor nociceptiva, inflamatória, disfuncional e a dor neuropática. A dor nociceptiva acontece a partir da ativação dos neurônios nociceptores do sistema nervoso somatossensorial periférico, isso devido a um dano real ao tecido não neural. A dor inflamatória é aquela gerada devido a um processo inflamatório, e tem sua intensidade acentuada por alguma pressão local. Já a dor disfuncional é geralmente suscitada sem qualquer estímulo externo, e não é associada a nenhuma função protetiva (COSTIGAN et al., 2009; WORLEY, 2016).

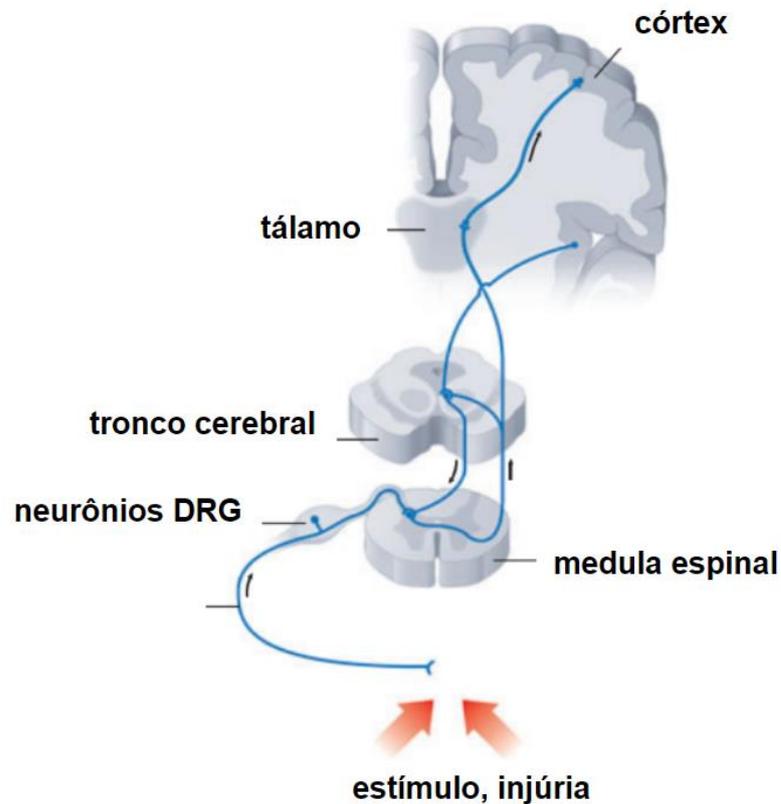
Por fim, a dor neuropática tem sua causa em lesões no sistema nervoso somatossensorial (SNS), essa sensação não é vista como um diagnóstico, e sim como uma descrição clínica. Diferentemente da dor nociceptiva - que acontece em um sistema nervoso saudável - a dor neuropática concerne à função anormal do SNS (COSTIGAN et al., 2009).

2.2.2 Transmissão da dor e nociceção

A dor tem sua transmissão efetivada via potenciais de ação desencadeados por um estímulo doloroso, esses potenciais de ação se propagam por neurônios nociceptores - também conhecidos como neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRGs) (Figura 4) (DIB-HAJJ et al., 2019) - que se encontram dentro de fibras neuronais específicas: fibras A δ e C, sendo os nociceptores os neurônios primários. Em seguida, os neurônios primários fazem aparência com neurônios secundários que levam esses estímulos ao sistema nervoso central (SNC) através da medula espinal (BELL, 2018; KLAUMANN et al., 2008).

Para a percepção de estímulos dolorosos, como calor, frio, pressão, inflamação, entre outros, são necessários receptores e canais iônicos. Uma das vias clássicas são os receptores de opioides, por serem da classe de receptores acoplados às proteínas G (GPCR) acabam por ativar fosfolipases, adenilil ciclases e proteínas quinases, todas essas enzimas modulam – diretamente e indiretamente – canais iônicos, como por exemplo os canais Nav. Moléculas inflamatórias também podem ser estímulos nocivos, como a exemplo de bradicininas e prostaglandinas, que também ativam receptores GPCR, levando mais uma vez à modulação dos canais iônicos. Outro grupo de canais iônicos – além dos Na_v – são os TRPs, responsáveis pelos estímulos associados à temperatura, sendo os TRPs também modulados pelos segundos mensageiros dos receptores GPCR (JULIUS et al., 2001).

Figura 4: esquema de transmissão de um estímulo do SNP até o SNC



Fonte: adaptado de COSTIGAN et al., 2009.

Transmissão de um estímulo doloroso via neurônios DRG até o córtex cerebral no SNC. Representação da medula espinhal, do tronco encefálico, do tálamo, do córtex e dos neurônios nociceptores DRG.

Para que a nocicepção aconteça, muitos mecanismos moleculares estão presentes, principalmente no que concerne a canais iônicos: canais Na_v , canais K_v , os canais de íons cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), os canais da família dos TRP (receptor de potencial transitório), entre outros, os quais se fazem muito presentes nas terminações de fibras $A\delta$ e C (HUDSPITH, 2016).

Cada um desses nociceptores moleculares têm uma determinada importância na nocicepção e no entendimento da dor, os TRPs - por exemplo - são associados às sensações de agentes irritantes e estímulos relacionados à temperatura, já os Ca_v dentre as diversas funções, são essenciais para a liberação de vesículas sinápticas. Enquanto que os canais Na_v e K_v são fundamentais para a iniciação dos potenciais de ação e para a repolarização do potencial de membrana, respectivamente (HUDSPITH, 2016; BELL, 2018).

2.4 Produtos naturais: a estratégia dos terpenóides

2.4.1 Óleos essenciais e sua constituição

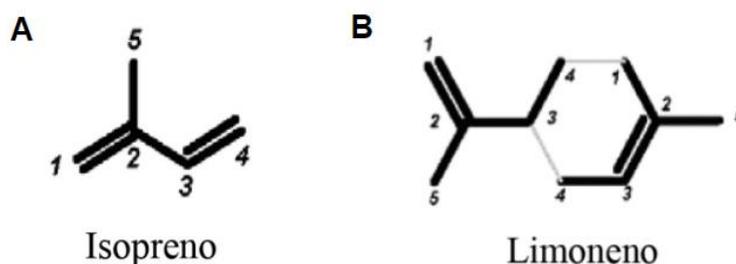
O termo essencial vem da palavra “essência”, referindo-se à fragrância de plantas. Os óleos essenciais (OEs) são compostos hidrofóbicos de plantas, que podem estar na forma gasosa ou líquida, sendo essas substâncias aromáticas voláteis. Os OEs têm status de terapias complementares no contexto clínico, em casos de dor, transtornos de ansiedade e depressão, entre outros (OZ et al. 2015).

Terpenóides - e alguns derivados de fenilpropanóides - são um dos componentes majoritários dos OEs. Assim, tanto os óleos essenciais, quanto os terpenóides, como exemplos os monoterpenos e os sesquiterpenos, já veem sendo estudados a algum tempo como terapias alternativas e adjuvantes (WANG et al., 2018; OZ et al. 2015).

2.4.2 Terpenóides

O termo terpenóide deriva de monoterpeno, que por sua vez são moléculas formadas de unidades de isoprenos (Figura 5). A nomenclatura terpenóide é usada quando essas estruturas formadas de isoprenos recebem um ou mais átomos de oxigênio, no entanto o termo terpeno ou terpenóide podem ser usados como sinônimos (FELIPE, 2017)

Figura 5: Estrutura do isopreno e do derivado monoterpeno limoneno



Fonte: adaptado de FELIPE, 2017.

Em A, a estrutura do hidrocarboneto insaturado denominado isopreno, que possui o esqueleto carbônico composto por cinco átomos de carbono. Em B, a estrutura do monoterpeno limoneno, formada por duas unidades de isoprenos.

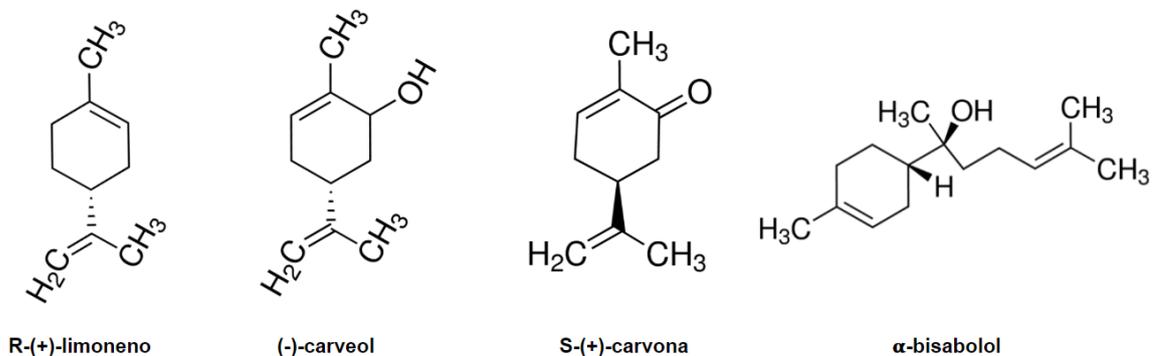
Os terpenóides podem ser classificados de acordo com o número de resíduos de isoprenos que os compõem: quando há duas unidades, nomeia-se monoterpeno, se houver três unidades, trata-se de um sesquiterpenóide e se houveram quatro unidades de isoprenos,

chama-se de diterpeno, e ultrapassando uma quantidade de oito unidades já se classifica como politerpeno (HARREWIJN et al., 2012; FELIPE, 2017).

Existem diversos derivados de isoprenos, muito deles com atividades biológicas constatadas em literatura (FELIPE, 2017; OZ et al. 2015). E de forma mais específica, muitos trabalhos mostram atividades de terpenóides em canais iônicos como os receptores GABA_A, receptor NMDA, canais da família dos TRPs e canais Na_v (como o metileugenol, inibidor do Nav 1.7) (WANG et al., 2015), sendo muitas dessas consideradas como atividade biológica antinociceptiva (WANG et al., 2018).

Entre esses terpenóides com a atividade relacionada à antinocicepção estão: R-(+)-limoneno, que apresentou atividade antinociceptiva em camundongos (AMARAL et al., 2007); (-)-carveol e S-(+)-carvona, ambas reduziram a excitabilidade de nervo de ratos adultos (GONÇALVES et al., 2010); e α -bisabolol, que desenvolveu ação antinociceptiva em rato e camundongo fêmeas (ROCHA et al., 2011), assim como bloqueou a excitabilidade de nervos periféricos (MIRANDA et al., 2010).

Figura 6: estrutura de alguns terpenóides



Fonte: Sigma-Aldrich

Estrutura dos terpenóides R-(+)-limoneno, (-)-carveol, S-(+)-carvona e α -bisabolol, da esquerda para a direita, respectivamente.

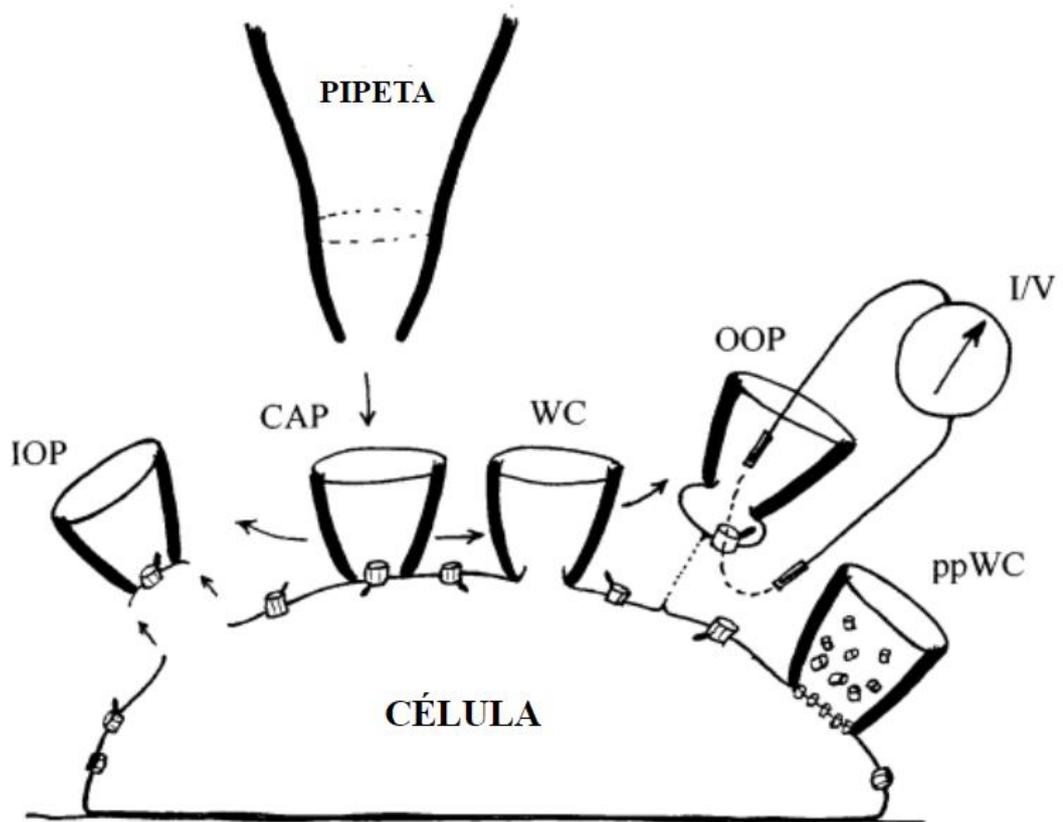
2.5 Técnica de *patch-clamp*

A palavra “*patch*” se refere à uma área definida da membrana, ou seja, uma região selecionada para que a micropipeta seja encostada, e “*clamp*” possui uma conotação eletrotécnica: submeter as células a um potencial de membrana (*voltage clamp*) ou a uma corrente elétrica (*current clamp*). O *voltage clamp* é usado no intuito de determinar corrente elétrica em células por meio da imposição de potenciais de membrana, enquanto que o *current*

clamp aplica-se corrente elétrica para determinar o potencial de membrana correspondente da membrana celular (YPREY et al., 2000).

Essa técnica compreende algumas configurações observadas na figura 7, entre elas estão: a configuração inicial CAP (*cell attached-patch*) que corresponde a micropipeta encostada na membrana celular, nesse momento o giga selo (selo entre pipeta e célula na ordem de gigaohm); configuração IOP (*inside-out patch*) que corresponde a romper um seguimento da membrana, separando-a da célula e medindo corrente em uma população menor de canais iônicos (YPREY et al., 2000; SAKMANN et al., 1984).

Figura 7: Esquema das configurações da técnica de *patch-clamp*



Fonte: Adaptado de YPREY et al., 2000.

A figura representa uma célula aderida em um substrato, na membrana da célula há a representação de canais iônicos (cilindros com estrias). As cinco configurações são esquematizadas em momentos diferentes: CAP (*cell attached-patch*), IOP (*inside-out patch*), WC (*whole Cell*), OOP (*outside-out patch clamp*) e ppWC (*permeabilized-patch whole cell*).

Outra forma de patch é o WC (*whole cell*) onde a membrana é perfurada e a população total de canais da célula é observada. E semelhante ao WC, o OOP (*outside-out*) é outra configuração de *patch-clamp*, também conhecida como *micro WC*, observando-se também população menor de canais iônicos (Figura 7). E por fim, o modo WC permeabilizado ou

ppWC (*permeabilized-patch Whole Cell*), que consiste em atingir o *whole cell* (perfurar a membrana) com o auxílio de uma substância formadora de poros, como exemplo o uso de anfotericina na perfuração (Figura 7) (YPREY et al., 2000; SAKMANN et al., 1984; WENDT et al., 1992).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Observar a ação dos terpenóides R-(+)-limoneno, α -bisabolol, (-)-carveol e S-(+)-carvona sobre a corrente de sódio de canais Na_v 1.7, e seus efeitos citotóxicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Observar o efeito dos terpenóides R-(+)-limoneno, α -bisabolol, (-)-carveol e S-(+)-carvona sobre a corrente de sódio de canais Na_v 1.7 humanos em células CHO-h Na_v 1.7;
- Observar a citotoxicidade dos terpenóides R-(+)-limoneno, α -bisabolol, (-)-carveol e S-(+)-carvona nas linhagens celulares SH-SY5Y e CHO-h Na_v 1.7.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soluções e substâncias

4.1.1 Derivados terpenóides

Os derivados R-(+)-limoneno (Fluka™), α -bisabolol (Fluka™), (-)-carveol (Sigma-Aldrich™) e S-(+)-carvona (Sigma-Aldrich™) e foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich™) resultando em uma solução mãe estocada a -20 °C. Anteriormente ao experimento, essa solução foi diluída em solução externa e em meios de cultivo celular, para os experimentos de *patch-clamp* e de viabilidade celular (citotoxicidade), respectivamente.

4.1.2 Soluções para os experimentos de “*patch-clamp*”

Composição da solução externa (que banha externamente as células plaqueadas em lamínulas) usada: NaCl a 145 mM, KCl a 4 mM, CaCl₂ a 2 mM, MgCl₂ a 1 mM, HEPES a 10 mM e glicose a 10 mM, com pH = 7,4 e osmolaridade de 301 mOsm.

Composição da solução interna (com a qual se preenche a micropipeta de vidro) usada: CsF a 140 mM, EGTA a 1 mM, HEPES a 10 mM e NaCl a 10 mM, com pH = 7,3 e osmolaridade de 319 mOsm.

4.1.3 Soluções para cultivo celular

PBS (Solução tampão fosfato-salina): NaCl a 136,88 mM, KCl a 2,7 mM, KH₂PO₄ a 0,9 mM e NaHPO₄ a 6,4 mM. Solução Tripsina-EDTA: tripsina (0,25 mg/mL) e EDTA (0,186 mg/mL). DMEM/F12 para as células SH-SY5Y: DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 1 mM de Piruvato de sódio, bicarbonato de sódio (1,5 mg/mL), F-12 e 10% de SBF (soro fetal bovino). DMEM para as células CHO-hNav 1.7: 1 mM de Piruvato de sódio, bicarbonato de sódio (1,5 mg/mL), 4,5 mg/mL de D-glicose anidra, 1% de antibiótico G418 (geneticina), 4 mM de L-glutamina e 10% de SBF. Solução de Azul de Tripán 4%: 40 mg/mL em PBS.

4.1.4 Soluções e substâncias para experimento de citotoxicidade

Além de todas as soluções do tópico anterior, inclui-se a solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a 5 mg/mL em PBS. Além disso, há o uso de DMSO (sulfóxido de dimetila) para a solubilização dos cristais de formazan.

4.2 Cultura celular

A linhagem celular SH-SY5Y e CHO hNav_v 1.7 foram cultivados nos meios DMEM alta glicose complementado com 50% de F-12 e 10% de SBF (soro bovino fetal) e DMEM alta glicose complementado com 10% de SBF e 1% do antibiótico geneticina, respectivamente. Sendo o meio trocado a cada 2 dias para a CHO-hNav_v 1.7 e a cada 4 (até 7) dias para a SH-SY5Y. As condições de incubação foram as mesmas para ambas: a 37 °C e 5% CO₂.

4.3 Patch-clamp

O efeito dos derivados terpenóides na corrente de sódio de canais Na_v 1.7 foi avaliado em células CHO (chinese hamster ovary) que expressavam de forma estável a subunidade alfa dos canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 de humanos (CHO-hNav_v 1.7). As células foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Beirão (UFMG), elas passaram por uma transfecção estável, a qual foi mantida permanentemente com o cultivo em 1% do antibiótico G418 (geneticina).

As correntes do Na_v 1.7 foram obtidas com a técnica de *patch-clamp* no modo *whole-cell voltage clamp*. Para isso, foi necessário o uso de um microscópio invertido (Carls Zeiss, Alemanha) sobre uma mesa antivibratória equipada com suspensão pneumática (TMC, EUA). Acoplado ao manipulador mecânico, usou-se um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) para a movimentação fina da micropipeta a ser encostada na célula (*cell attached-patch*).

Após a pipeta tocar a células, uma leve sucção com uma seringa acoplada ao interior da micropipeta foi realizada para que o giga selo fosse atingido (>1GΩ), e depois uma forte sucção para o rompimento da membrana, atingindo-se o modo *whole-cell*. Então, utilizou-se um protocolo de pulsos de voltagens para a observação das correntes: o potencial de *holding*

de -90 mV, depois um pré-pulso de -120 mV e posteriormente o pulso despolarizante de 0 mV (durante 200 ms) e então o pulso fecha com o potencial de *holding* mais uma vez.

As micropipetas de vidro foram adquiridas a partir de capilares de vidro (Perfecta, Brasil) de 75 mm polidos em um *puller* de dois estágios (Narishige, Japão), a resistência da micropipeta foi de 2-5 M Ω . Essas micropipetas foram preenchidas com a solução interna, foram aproximadas das células CHO-hNav 1.7, que estavam plaqueadas em lamínulas e banhadas com solução externa. Após encostar a micropipeta na membrana das células, obteve-se a configuração de *whole-cell* e então o protocolo de pulsos foi iniciado.

4.4 Citotoxicidade: método de redução do MTT

O ensaio de redução do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) permite avaliar parâmetros indicativos de citotoxicidade, por meio da atividade metabólica celular, que por sua vez é quantificada de forma colorimétrica (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal solúvel em água, que ao ter seu anel de tetrazólio rompido - devido a redução causada pela interação com produtos das vias de desidrogenases mitocondriais e outras enzimas presentes em lisossomos: NADH e NADPH - é convertido a cristais de formazan de cor púrpura insolúveis em água (LIU et al., 1997)

As células passaram por processo de desprendimento do frasco de cultura por ação da tripsina-EDTA, em seguida foram centrifugadas a 300g em temperatura ambiente (25 °C), o pellet foi ressuspendido em meio de cultivo completo, e então a viabilidade e a concentração celular foram determinada em câmara de Neubauer, usando-se azul de tripan. Na sequência, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços em concentração de 3×10^4 células por poço, e então foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂ por 24h. Depois de serem incubadas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos derivados terpenóides durante 24h. As concentrações foram de 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 e 125 μ M, ao fim do tratamento de 24h, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO, e então os resultados das placas foram lidos a 570 nm em espectrofotômetro BioTek EL800 (Biosystems).

4.5 Análise Estatística

4.5.1 Análise da Citotoxicidade

Os resultados foram mostrados como média \pm D.P (desvio padrão) e são resultados de três experimentos independentes ($n = 3$). Os valores obtidos dos experimentos de citotoxicidade foram normalizados em comparação à média do grupo controle (não tratado). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) *One-way*, seguidos de pós-teste de Bonferroni, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao controle, sendo as análises estatísticas executadas no programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, USA)

4.5.2 Análise do “patch-clamp”

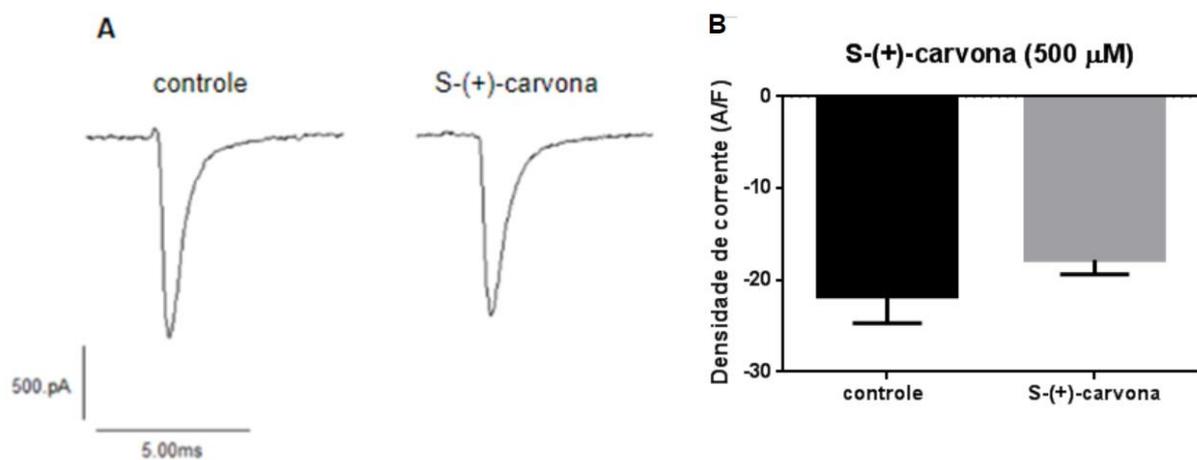
A análise estatística levou em consideração a média \pm D.P. (desvio padrão), e os gráficos representados com a média \pm E.P.M. (erro padrão da média), por uma questão de estética. As correntes obtidas dos experimentos de *patch-clamp* foram normalizadas em relação à capacitância das respectivas células ($n = 5$), dividindo-se corrente por capacitância, resultando em densidade de corrente A/F (ampère por Faraday). Os resultados das densidades de corrente foram analisados por teste *t* de *Student* (teste pareado) do grupo tratado em relação ao controle (não tratado, com apenas o registro). Os valores de “p” foram pontuados em significância estatística como o seguinte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao controle, sendo as análises estatísticas executadas no programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, USA), e os dados foram adquiridos no Software FitMaster/HEKA.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados dos experimentos de *patch-clamp*

Os efeitos dos quatro terpenóides nas correntes de Na^+ subtipo Na_v 1.7 foram observadas em células CHO-h Na_v 1.7, linhagem comumente usada para estudos de canais iônicos isolados (GODAZGAR et al., 2018; MOYER et al., 2018). Nos experimentos de *patch-clamp*, dois terpenóides tiveram efeitos estatisticamente significantes, com destaque para os terpenóides R-(+)-limoneno e α -bisabolol, que resultaram na maior porcentagem de inibição da densidade de corrente em canais Na_v 1.7: 36,6% e 69,5%, respectivamente.

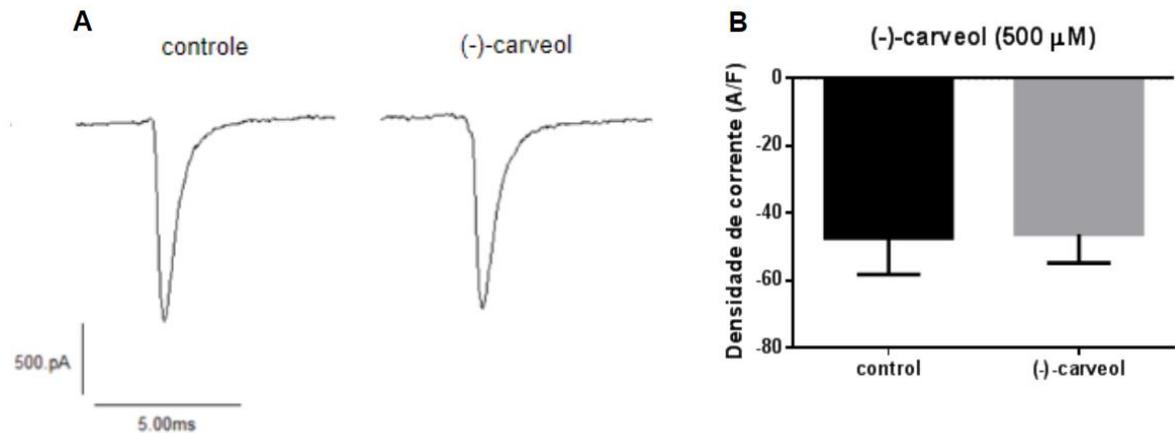
Figura 8: Efeito da S-(+)-carvona nas correntes totais do Na_v 1.7 em células CHO-h Na_v 1.7



Em **A** observa-se o registro representativo da corrente de Na^+ em CHO-h Na_v 1.7, em situação de perfusão com S-(+)-carvona, junto ao seu respectivos controle. A escala de corrente em picoampère (pA) por tempo em milissegundo (ms) é mostrada logo abaixo do registro, na proporção de 500 pA por 5 ms. Em **B** as mesmas situações estão indicadas em um gráfico expressando densidade de corrente (A/F) em função dos grupos controle e do perfundido com S-(+)-carvona. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, esses foram analisados por teste t pareado.

A inibição da corrente do Na_v 1.7 com base nas diferenças das médias de densidades de corrente na perfusão com S-(+)-carvona foi de 18,07% (Tabela 1), onde a redução da densidade foi de $-21,75 \pm 2,95$ (controle) para $-17,82 \pm 1,55$ (tratado) (Figura 8.B), já na situação com (-)-carveol a redução foi de $-47,46 \pm 10,76$ (controle)(Figura 9.B) para $-46,23 \pm 8,62$ (tratado), correspondendo à inibição de 2,59% (Tabela 1).

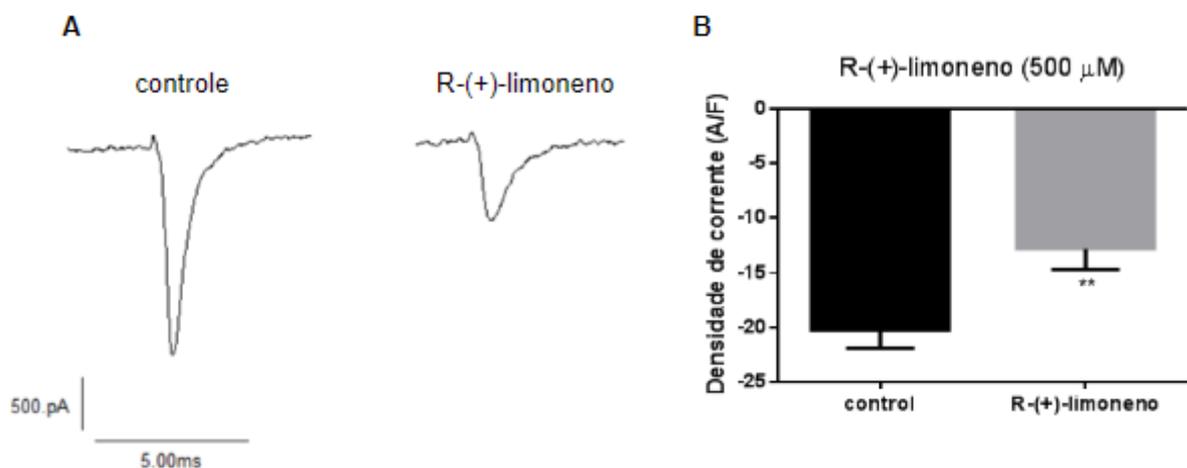
Figura 9: Efeito do (-)-carveol nas correntes totais do $\text{Na}_v 1.7$ em células CHO-h $\text{Na}_v 1.7$



Em **A** observa-se o registro representativo da corrente de Na^+ em CHO-h $\text{Na}_v 1.7$, em situação de perfusão com (-)-carveol, junto ao seu respectivos controle. A escala de corrente em picoampère (pA) por tempo em milissegundo (ms) é mostrada logo abaixo do registro, na proporção de 500 pA por 5 ms. Em **B** as mesmas situações estão indicadas em um gráfico expressando densidade de corrente (A/F) em função dos grupos controle e do perfundido com (-)-carveol. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, esses foram analisados por teste t pareado.

Por tanto, os terpenóides S-(+)-carvona e (-)-carveol, não apresentaram efeito estatisticamente significativo na redução da corrente de Na^+ em células CHO-h $\text{Na}_v 1.7$, o que também pode ser preditivamente notado na comparação entre os picos de correntes nos registros representativos (Figuras 8.A e 9.A).

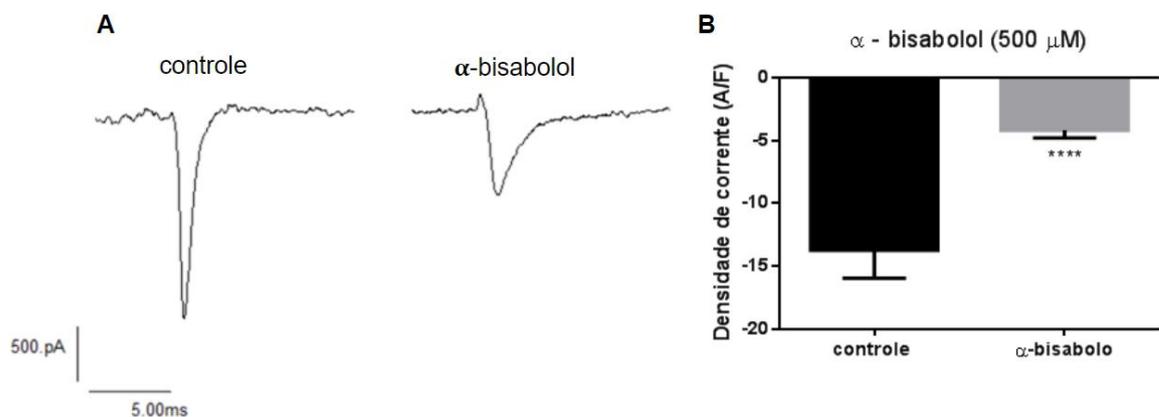
Figura 10: Efeito do R-(+)-limoneno nas correntes totais do $\text{Na}_v 1.7$ em células CHO-h $\text{Na}_v 1.7$



Em **A** observa-se o registro representativo da corrente de Na^+ em CHO-h $\text{Na}_v 1.7$, em situação de perfusão com R-(+)-limoneno, junto ao seu respectivos controle. A escala de corrente em picoampère (pA) por tempo em milissegundo (ms) é mostrada logo abaixo do registro, na proporção de 500 pA por 5 ms. Em **B** as mesmas situações estão indicadas em um gráfico expressando densidade de corrente (A/F) em função dos grupos controle e do perfundido com R-(+)-limoneno. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, esses foram analisados por teste t pareado. Sendo ** $p < 0,01$.

A ação desses compostos levou a uma inibição de 36,6% e 69,5% (Tabela 1) em relação às correntes controle, ou seja, nas células não perfundidas. Consequentemente, esse efeito também se expressa pela alteração da densidade de corrente - na ordem de pA/pF - reduzindo a densidade de corrente de $-23,45 \pm 2,41$ (controle) para $-14,87 \pm 2,41$ (tratado) no caso do R-(+)-limoneno (Figura 10.B), e perfundida com α -bisabolol, a densidade de corrente foi reduzida de $-13,71 \pm 2,23$ (controle) para $-4,18 \pm 0,62$ (tratado) (Tabela 1 e Figura 11.B).

Figura 11: Efeito do α -bisabolol nas correntes totais do $\text{Na}_v 1.7$ em células CHO-h $\text{Na}_v 1.7$



Em **A** observa-se o registro representativo da corrente de Na^+ em CHO-h $\text{Na}_v 1.7$, em situação de perfusão com α -bisabolol, junto aos seus respectivos controles. A escala de corrente em picoampère (pA) por tempo em milissegundo (ms) é mostrada logo abaixo do registro, na proporção de 500 pA por 5 ms. Em **B** as mesmas situações estão indicadas em um gráfico expressando densidade de corrente (A/F) em função dos grupos controle e do perfundido com α -bisabolol. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M, esses foram analisados por teste t pareado. Sendo **** $p < 0,0001$.

Logo, os terpenóides R-(+)-limoneno e α -bisabolol tiveram efeitos pronunciados na corrente de $\text{Na}_v 1.7$ nas células CHO com expressão estável da subunidade alfa humana dos canais $\text{Na}_v 1.7$, comparado à S-(+)-carvona e ao (-)-carveol, percebendo-se diminuição notória nos picos de corrente (Figuras 10.A e 11.A).

Tabela 1: Valores de densidade de corrente e as respectivas percentagens de inibição pelos diferentes terpenóides

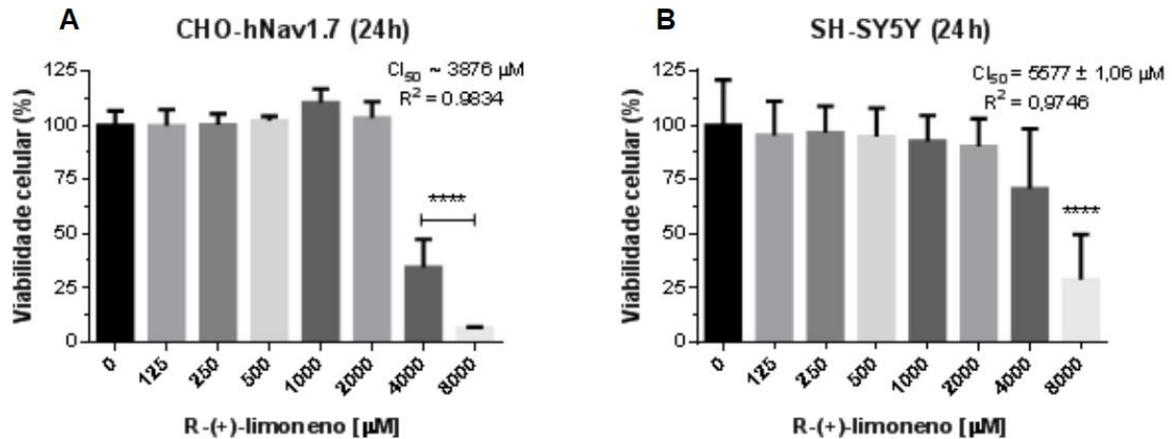
TERPENÓIDES	<i>CONTROLE (A/F)</i>	<i>TRATADO (A/F)</i>	<i>INIBIÇÃO (%)</i>
<i>S-(+)-carvona</i>	-21,75 ± 2,95	-17,82 ± 1,55	18,07
<i>(-)-carveol</i>	-47,46 ± 10,76	-46,23 ± 8,62	2,59
<i>R-(+)-limoneno</i>	-23,45 ± 2,41	-14,87 ± 2,41	36,6 *
<i>α-bisabolol</i>	-13,71 ± 2,23	-4,18 ± 0,62	69,5 *

Tabela dos valores de densidade de corrente em ampere por faraday (A/F) nas células CHO-hNa_v 1.7 em situação controle e tratada, com o valor de inibição dos respectivos terpenóides. Nas linhas das colunas da esquerda para a direita estão respectivamente: terpenóides, as densidades controles, as densidades após o tratamento com os terpenóides e na extrema direita estão os valores de inibição das densidades de corrente após o tratamento. Os dados estão expressos como média ± E.P.M, esses foram analisados por teste t pareado. Sendo *p<0,05.

5.2- Resultados dos Experimentos de Citotoxicidade

Nos ensaios de citotoxicidade foram usadas duas linhagens celulares: CHO-hNa_v 1.7 e SH-SY5Y, a primeira foi a célula usada nos experimentos de eletrofisiologia, a outra linhagem se trata de uma célula de origem neuronal que compartilha semelhanças com neurônios DRGs. Os compostos com cada célula tiveram CI₅₀ de 24h obtidas no ensaio de viabilidade com três repetições independentes, cujo valores de CI₅₀ foram todos superiores a 1000 μM, sendo a menor CI₅₀ pertencente ao α-bisabolol, enquanto a maior CI₅₀ foi a do R-(+)-limoneno.

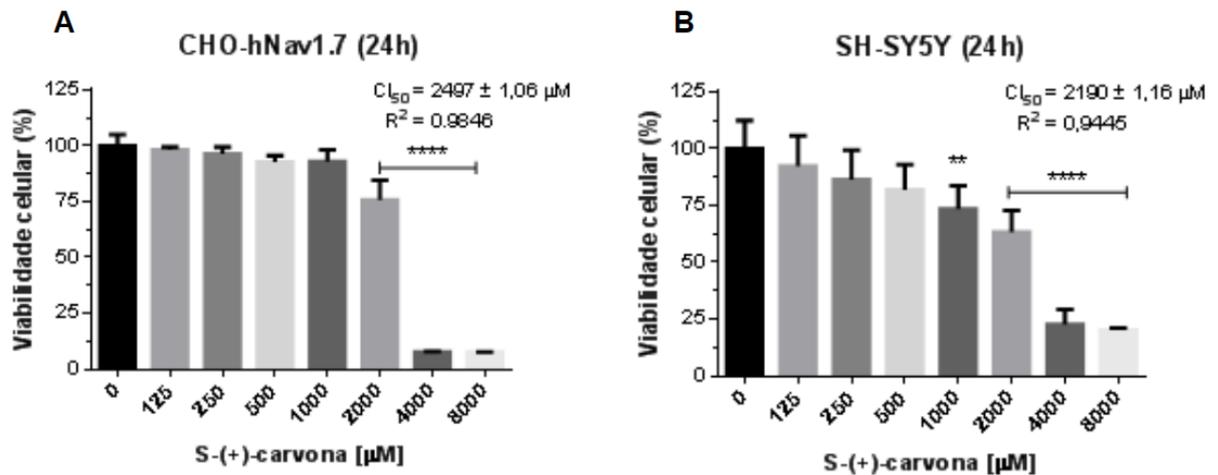
Figura 12: Citotoxicidade do R-(+)-limoneno em células CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y



Em **A** e **B** as curvas de viabilidade celular da linhagem CHO-hNav_v 1.7 e SH-SY5Y, respectivamente sob tratamento com o R-(+)-limoneno. Cada curva está acompanhada com os respectivos valores das CI_{50} e os coeficientes de correlação R^2 . Os dados estão expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. Analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle (concentração $0 \mu\text{M}$).

O R-(+)-limoneno apresentou menor citotoxicidade, sendo a CI_{50} na linhagem SH-SY5Y de $5577 \pm 1,06 \mu\text{M}$ e em CHO-hNav_v 1.7 foi na ordem de $3876 \mu\text{M}$, sendo essas os maiores valores de CI_{50} em ambas linhagens (Tabela 2). Além disso, as concentrações que tiveram efeito em relação ao controle foram as maiores - de $8000 \mu\text{M}$ nas células SH-SY5Y (Figura 12.B) - e as de $4000 \mu\text{M}$ e $8000 \mu\text{M}$ no caso da linhagem CHO-hNav_v 1.7 (Figura 12.A).

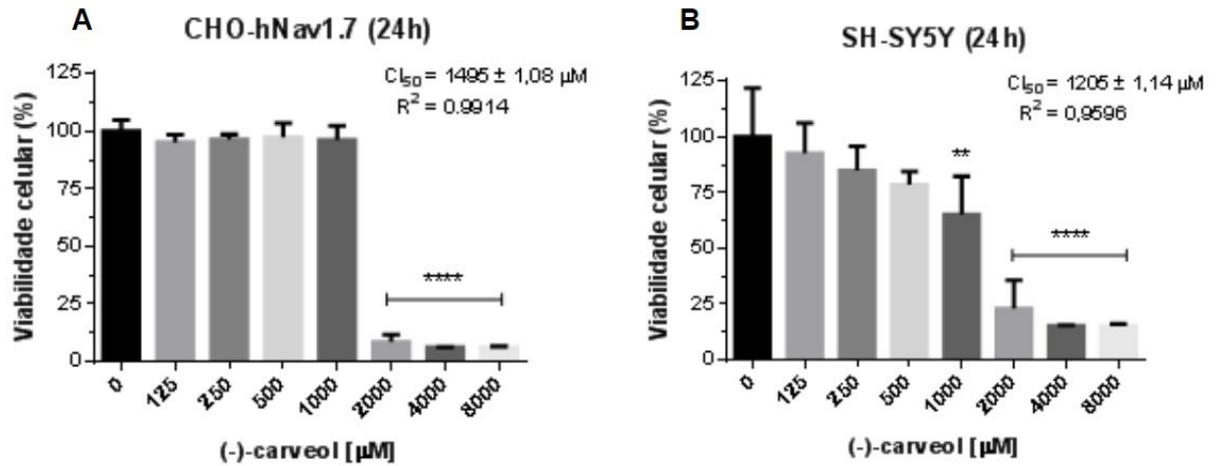
Figura 13: Citotoxicidade da S-(+)-carvona em células CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y



Em **A** e **B** as curvas de viabilidade celular da linhagem CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y, respectivamente sob tratamento com a S-(+)-carvona. Cada curva está acompanhada com os respectivos valores das CI₅₀ e os coeficientes de correlação R². Os dados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes. Analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Sendo *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001 em relação ao grupo controle (concentração 0 µM).

A S-(+)-carvona por sua vez, foi mais citotóxica à linhagem SH-SY5Y: com CI₅₀ de 2190 ± 1,16 µM, e na linhagem CHO-hNav 1.7, com a IC₅₀ de 2497 ± 1,06 µM (Tabela 2). No caso desse terpenóide, a partir das concentrações intermediárias de 1000 µM até a de 8000 µM, houveram efeitos citotóxicos com significância estatística em relação ao controle para a linhagem SH-SY5Y (Figura 13.B). Já nas células CHO-hNav 1.7, as concentrações a partir de 2000 µM até a de 8000 µM apresentaram efeito citotóxico (Figura 13.A).

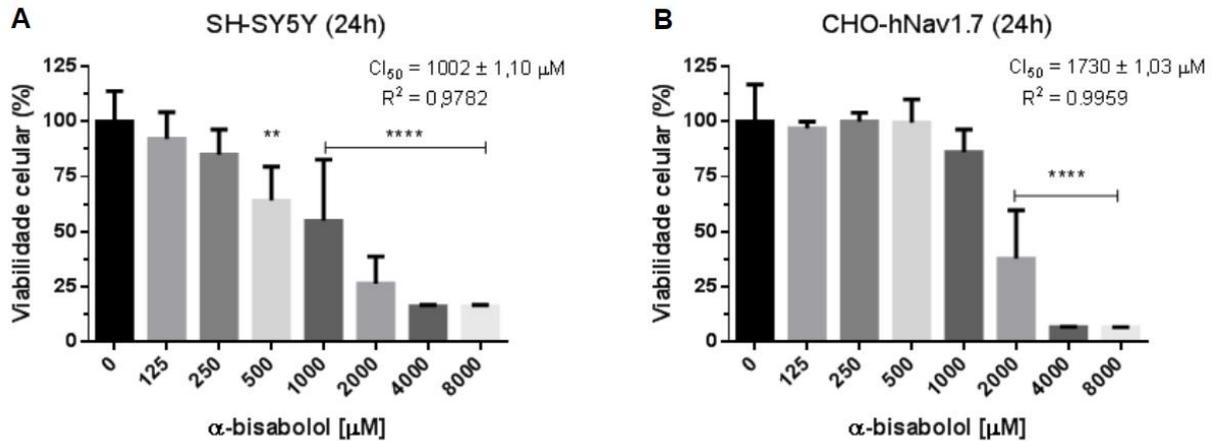
Figura 14: Citotoxicidade do (-)-carveol em células CHO-hNav_v 1.7 e SH-SY5Y



Em A e B as curvas de viabilidade celular da linhagem CHO-hNav_v 1.7 e SH-SY5Y, respectivamente sob tratamento com o (-)-carveol. Cada curva está acompanhada com os respectivos valores das CI_{50} e os coeficientes de correlação R^2 . Os dados estão expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. Analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle (concentração 0 μM).

O (-)-carveol foi mais citotóxico que a S-(+)-carvona, com os valores de CI_{50} de $1205 \pm 1,14 \mu\text{M}$ para a SH-SY5Y, e a CI_{50} para a CHO-hNav 17 foi de $1495 \pm 1,08 \mu\text{M}$ (Tabela 2). E assim como a S-(+)-carvona, as concentrações a partir das intermediárias apresentaram efeito citotóxico com significância estatística: para as SH-SY5Y as concentrações de 1000, 2000, 4000 e de 8000 μM (Figura 14.B), já para as células CHO-hNav 1.7 essa significância está para as concentrações de 2000 à 8000 μM (Figura 14.A).

Figura 15: Citotoxicidade do α -bisabolol em células CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y



Em **A** e **B** as curvas de viabilidade celular da linhagem CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y, respectivamente sob tratamento com o α -bisabolol. Cada curva está acompanhada com os respectivos valores das CI_{50} e os coeficientes de correlação R^2 . Os dados estão expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. Analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle (concentração 0 μM).

Entre os terpenóides o α -bisabolol foi o mais citotóxico, o qual teve a CI_{50} igual a $1002 \pm 1,10 \mu\text{M}$ na SH-SY5Y, e igual a $1730 \pm 1,03 \mu\text{M}$ nas células CHO-hNav 1.7 (Tabela 2). A significância do efeito citotóxico apareceu a partir da concentração de 500 μM (** $p < 0,01$) na linhagem SH-SY5Y (Figura 15.B), enquanto que na CHO-hNav 1.7 a significância aparece nas concentrações de 2000, 4000 e 8000 C (**** $p < 0,0001$) (Figura 15.A).

Tabela 2: Valores das CI_{50} dos terpenóides em células CHO-hNav 1.7 e SH-SY5Y

TERPENÓIDES	SH-SY5Y	R^2	CHO-hNav 1.7	R^2
<i>R</i> -(+)-limoneno	$5577 \pm 1,06 \mu\text{M}$	0,9834	3876 μM	0,9834
<i>S</i> -(+)-carvona	$2190 \pm 1,16 \mu\text{M}$	0,9445	$2497 \pm 1,06 \mu\text{M}$	0,9846
(-)-carveol	$1205 \pm 1,14 \mu\text{M}$	0,9596	$1495 \pm 1,08 \mu\text{M}$	0,9914
α -bisabolol	$1002 \pm 1,10 \mu\text{M}$	0,9782	$1730 \pm 1,03 \mu\text{M}$	0,9959

Tabela dos valores de CI_{50} no tempo de 24h dos terpenóides nas células SH-SY5Y e CHO-hNav 1.7, com seus respectivos coeficientes de correlação R^2 .

6 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais já são usados a milênios, com diversas finalidades: de medicamentos a cosméticos (FELIPE et al., 2017). É nos OEs que encontramos a classe de substâncias denominada terpenóides, que têm suas propriedades como objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa, enfatizando os potenciais terapêuticos dessa classe, inclusive as atividades antinociceptivas (OZ et al. 2015; WANG et al., 2018) incluindo os terpenóides objetos de estudo no presente trabalho: R-(+)-limoneno, α -bisabolol, (-)-carveol e S-(+)-carvona.

O (-)-carveol já teve sua atividade modulatória em potenciais de ação composto (PAC)(potencial da fibra nervosa, mais especificamente o nervo ciático) descrita tanto em rãs (*Rana nigromaculata*) (KAWASAKI et al., 2013), quanto em ratos *wistars* adultos (Gonçalves et al., 2010). Ambos trabalhos avaliaram a ação do terpenóide sobre o PAC do nervo ciático dos respectivos espécies, nos quais foi notada a ação inibitória do (-)-carveol sobre os PACs. Dada a importância do canal Na_v para o potencial de ação citada anteriormente (KRUEGER-BECK et al., 2011), os efeitos no PAC são evidencialmente atribuídos aos Na_v .

De forma análoga, a (+)-carvona desempenha a inibição sobre o PAC de rãs e de ratos (KAWASAKI, 2013; GONÇALVES et al., 2010), por mais que haja uma diferença entre as espécies, pois a CI_{50} de (+)-carvona em ratos foi de 8.7 mM, enquanto que em rãs foi de 2.0 mM. Além disso, o isômero (-)-carvona tem o mesmo comportamento: CI_{50} em ratos igual a 10.7 mM, e em rãs igual a 1.4 mM. Essa diferença foi atribuída à possibilidade de uma diferença estrutural entre os Na_v de rato e de rã (KAWASAKI et al., 2013).

Porém, nos experimentos em que avaliamos a atividade da (+)-carvona e do (-)-carveol em correntes de Na^+ de canais $Na_v 1.7$, os efeitos de redução da corrente não foram observados, levando a duas possibilidades: ou se trata da mesma suspeita de Kawasaki (2013), podendo haver uma diferença estrutural entre os Na_v (nesse caso o $Na_v 1.7$) das espécies envolvidas. Outra possibilidade é que esses resultados podem estar evidenciando uma ação em outros subtipos de canais, podem ser os Na_v TTX-R presentes em neurônios DRG também: $Na_v 1.8$ e $Na_v 1.9$. Pois, uma vez que os três subtipos se fazem presentes em neurônios DRG (CATTERALL, 2012; DIB-HAJJ et al., 1999).

Ao contrário desses dois terpenóides, o (+)-limoneno apresentou um efeito minimamente pronunciado sobre os PACs citados anteriormente (KAWASAKI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2010), e de forma diametralmente oposta, o R-(+)-limoneno foi efetivo

em diminuir a corrente do Na_v 1.7 nas células CHO-h Na_v 1.7. Além disso, Amaral (2007) demonstra a ação antinociceptiva do R-(+)-limoneno, excluindo inclusive a clássica via dos opioides como a responsável pelo efeito, porém atribui a ação antinociceptiva aos mecanismos antiinflamatórios trabalhados na pesquisa também (AMARAL et al., 2007).

Kawasaki (2013) explica que as ínfimas ações do (+)-limoneno em relação aos outros terpenóides estudados, é devido a sua estrutura simples, uma vez que se trata de um hidrocarboneto insaturado. Já os outros compostos, possuem átomos de oxigênio, formando grupos C=O (carbonila) e C-OH (hidroxilas). Contudo, uma possível explicação para essa complicação sobre o R-(+)-limoneno, é o efeito de estresse na curvatura da bicamada lipídica, no entanto isso é uma extrapolação do raciocínio, pois se baseia em um estudo com canais iônicos de gramicidina A. Devido o limoneno ser uma molécula apolar, ele se incorpora à membrana plasmática, levando à uma pressão lateral gerando um estado de estresse, induzindo uma superfície côncava, isso fez com que surgisse um efeito de inibição na correntes de íons através do canal de gramicidina A (ANDERSEN et al., 1999).

Já o α -bisabolol teve seus resultados mais compatível com os observados na literatura, pois há relatada a ação antinociceptiva in vivo (ratos e camundongos) (ROCHA et al., 2011), bem como a capacidade de inibição de PAC em nervo ciático de ratos adultos. No trabalho de Miranda et al., (2010), é destacada a dependência de concentração do (-)- α -bisabolol, e foi notado que a 0.5 mM o terpenóide não apresentou efeito, diferentemente no que se observou nos experimentos com Na_v 1.7. Portanto, ainda na lógica das expressões dos subtipos Na_v 1.7, Na_v 1.8 e Na_v 1.9, o resultado nas correntes de Na_v 1.7 pode estar indicando uma especificidade pelo subtipo estudado.

No intuito de descartar alguma influência da citotoxicidade sobre as correntes de Na_v 1.7 observadas no *patch-clamp*, o ensaio de redução do MTT foi realizado na linhagem teste CHO-h Na_v 1.7, e também em uma linhagem alternativa utilizada como modelo para os neurônios DRG: a linhagem celular SH-SY5Y (YIN et al., 2016).

A clivagem do MTT permite demonstrar a presença de células vivas, e metabolicamente ativas, sendo a quantidade de cristais de formazan diretamente ligada ao número de células nas condições citadas (MOSMANN, 1983). E de forma geral, essa metabolização continuou funcionando nem todos os grupos de célula CHO-h Na_v 1.7 tratados com os terpenóides até 1000 μM - sendo as CI_{50} todas acima de 1000 μM (Tabela 2) - descartando a possibilidade de as correntes observadas no tratamento com os terpenóides (a 500 μM), serem devido uma provável atividade citotóxica dos composto na concentração teste.

Entre as duas linhagens celulares, os terpenóides foram mais agressivos à SH-SY5Y, uma vez que as CI_{50} para essa linhagem foram menores. E somado a isso, o efeito citotóxico dos terpenóides aparecem em concentrações superiores a $1000 \mu M$, com exceção do R-(+)-limoneno, que foi o menos citotóxico. Sabendo que a linhagem neuronal SH-SY5Y expressa predominantemente canais Na_v 1.7 dentre todos os canais Na_v (VETTER et al., 2012), a ação mais citotóxica entre esses: notada com o α -bisabolol, poderia ser atribuída à inibição dos canais Na_v 1.7 em células SH-SY5Y. No entanto, Perez-Castro et al., 2009 mostrou que a citotoxicidade do anestésico local (AL) Lidocaína - por exemplo - na mesma linhagem neuronal, não é devido a inibição de Na_v , uma vez que o efeito citotóxico não foi percebido quando a SH-SY5Y foi tratada com TTX (sendo o Na_v 1.7 sensível à TTX) (PEREZ-CASTRO et al., 2009).

Assim como observado na literatura, os ensaios de redução do MTT destacaram que os átomos de oxigênio formando grupos -OH e C=O aumentam a citotoxicidade (CROWELL et al., 1992). Isso foi notado ao comparar as CI_{50} do limoneno em relação aos outros terpenóides que têm átomos de oxigênio em suas estruturas. Contudo - bem como o α -bisabolol - os demais terpenóides não apresentaram efeito citotóxico estatisticamente significativo na concentração de $500 \mu M$, uma vez que os experimentos de *patch-clamp* foram realizados nessa concentração, isso indica que as alterações nas correntes não foram em decorrência da citotoxicidade dessas moléculas.

Por conseguinte, é notória a ação da classe de terpenóides - sobretudo os que possuem grupos com átomos de oxigênio na estrutura - em mecanismos antinociceptivos e em canais Na_v , o que corrobora a antinocicepção. Foi possível observar em experimentos, evidências dessas atividades no canal de subtipo Na_v 1.7 na linhagem celular CHO-h Na_v 1.7, assim como a ação citotóxica desses compostos em linhagem neuronal humana SH-SY5Y - mas de forma a não influenciar nos registros de correntes de Na^+ . No entanto, ainda se faz necessário mais estudos nesse sentido, com o intuito de detalhar os mecanismos pelos quais os terpenóides agem.

7 CONCLUSÃO

- Os terpenóides R-(+)-limoneno e α -bisabolol, diminuíram a corrente de sódio dos canais Nav 1.7 na concentração de 500 μ M, levando a uma inibição da densidade de corrente em 36,6% e 69,5%, respectivamente;
- Os terpenóides S-(+)-carvona e o (-)-carveol não diminuíram a corrente de sódio dos canais Nav 1.7 na concentração de 500 μ M;
- As CI_{50} de todos os terpenóides foram superiores a 1mM para 24h de tratamento, demonstrando a baixa citotoxicidade dos terpenóides testados.

8 PERSPECTIVAS

No intuito de aprofundar o trabalho, com base nos dados adquiridos, as seguintes perspectivas foram traçadas para os terpenóides R-(+)-limoneno e α -bisabolol:

- Determinar a CI_{50} na corrente de sódio em células CHO-hNav 1.7;
- Avaliar a modulação da **dependência de voltagem** dos canais Nav 1.7;
- Avaliar a modulação da **inativação** dos canais Nav 1.7;
- Avaliar a modulação da **condutância** de íons Na^+ em canais Nav 1.7;
- Avaliar esses aspectos eletrofisiológico na linhagem neuronal SH-SY5Y.

REFERÊNCIAS

- Andersen, O. S., Nielsen, C., Maer, A. M., Lundbæk, J. A., Goulian, M., & Koeppe II, R. E. (1999). [10] Ion channels as tools to monitor lipid bilayer-membrane protein interactions: Gramicidin channels as molecular force transducers. In *Methods in enzymology* (Vol. 294, pp. 208-224). Academic Press.
- Aron de Miranda, H. A., Gonçalves, J. C. R., Cruz, J. S., & Araújo, D. A. M. (2010). Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. *Neuroscience letters*, *472*(1), 11-15.
- Bell, A. (2018). The neurobiology of acute pain. *The Veterinary Journal*, *237*, 55-62.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, *590*(11), 2577-2589.
- Chernov-Rogan, et al., 2018. Mechanism-specific assay design facilitates the discovery of Nav1.7-selective inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(4), E792-E801, 2018.
- Chong, M. S., & Brandner, B. Neuropathic agents and pain. New strategies. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *60*(7), p. 318-322, 2006.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience*, *32*, 1-32.
- Crowell, P. L., Kennan, W. S., Haag, J. D., Ahmad, S., Vedejs, E., & Gould, M. N. (1992). Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. *Carcinogenesis*, *13*(7), 1261-1264.
- Debanne, D., Bialowas, A., & Rama, S. (2013). What are the mechanisms for analogue and digital signalling in the brain?. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(1), 63.

Deuis, et al., 2017. Pharmacological characterisation of the highly Nav 1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Scientific reports*, 7, 40883, 2017.

Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2019). Sodium Channels in Human Pain Disorders: Genetics and Pharmacogenomics. *Annual review of neuroscience*, 42.

Dib-Hajj, S. D., Fjell, J., Cummins, T. R., Zheng, Z., Fried, K., LaMotte, R., ... & Waxman, S. G. (1999). Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *PAIN®*, 83(3), 591-600.

do Amaral, J. F., Silva, M. I. G., de Aquino Neto, M. R. A., Neto, P. F. T., Moura, B. A., de Melo, C. T. V., ... & de Sousa, F. C. F. (2007). Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), 1217-1220.

Drukarch, B., Holland, H. A., Velichkov, M., Geurts, J. J., Voorn, P., Glas, G., & de Regt, H. W. (2018). Thinking about the nerve impulse: A critical analysis of the electricity-centered conception of nerve excitability. *Progress in neurobiology*, 169, 172-185.

Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Esc*, 39(2), 120-30.

Frank, H. Y., & Catterall, W. A. (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science Signaling*, 2004(253), re15.

Godazgar, M., Zhang, Q., Chibalina, M. V., & Rorsman, P. (2018). Biphasic voltage-dependent inactivation of human Nav1. 3, 1.6 and 1.7 Na⁺ channels expressed in rodent insulin-secreting cells. *The Journal of physiology*, 596(9), 1601-1626.

Gonçalves, J. C. R., Aron de Miranda, H. A., de Araújo, A. E. V., Cruz, J. S., & Araújo, D. A. M. (2010). Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. *European journal of pharmacology*, 645(1-3), 108-112.

Harrewijn, P., Van Oosten, A. M., & Piron, P. G. (2012). *Natural terpenoids as messengers: A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications*. Springer Science & Business Media.

Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* 2nd ed. (Sinauer Associates Inc., 1992).

Howard, D. (2016). *Delayed expression of plasticity in neuronal excitability induced by coactivation of NMDAR and mGluR at a developing central synapse* (Doctoral dissertation, University of Toronto (Canada)).

Hudspith, M. J. (2016). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 17(9), 425-430.

Julius, D., & Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203.

Kawasaki, H., Mizuta, K., Fujita, T., & Kumamoto, E. (2013). Inhibition by menthol and its related chemicals of compound action potentials in frog sciatic nerves. *Life sciences*, 92(6-7), 359-367.

Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F., & Sillas, T. (2008). Patofisiologia da dor. *Archives of veterinary science*, 13(1).

Krueger-Beck, E., Scheeren, E. M., Nogueira-Neto, G. N., Button, V. L. D. S. N., Neves, E. B., & Nohama, P. (2011). Action potential: from excitation to neural adaptation. *Fisioterapia em Movimento*, 24(3), 535-547.

Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, 69(2), 581-593.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

- Moyer, B. D., Murray, J. K., Ligutti, J., Andrews, K., Favreau, P., Jordan, J. B., ... & Shi, L. (2018). Pharmacological characterization of potent and selective Nav1.7 inhibitors engineered from *Chilobrachys jingzhao* tarantula venom peptide JzTx-V. *PloS one*, *13*(5), e0196791.
- Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K. H. S., & Galadari, S. (2015). Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacology & therapeutics*, *152*, 83-97.
- Perez-Castro, R., Patel, S., Garavito-Aguilar, Z. V., Rosenberg, A., Recio-Pinto, E., Zhang, J., ... & Xu, F. (2009). Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesthesia & Analgesia*, *108*(3), 997-1007.
- Renganathan, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Contribution of Nav 1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of neurophysiology*, *86*(2), 629-640.
- Rocha, N. F. M., Rios, E. R. V., Carvalho, A. M. R., Cerqueira, G. S., de Araújo Lopes, A., Leal, L. K. A. M., ... & de Sousa, F. C. F. (2011). Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *384*(6), 525-533.
- Sakmann, B., & Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology*, *46*(1), 455-472.
- Stanos, S., Brodsky, M., Argoff, C., Clauw, D. J., D'Arcy, Y., Donevan, S., ... & Park, P. W. (2016). Rethinking chronic pain in a primary care setting. *Postgraduate Medicine*, *128*(5), 502-515.
- Vervoort, T., & Trost, Z. (2016). The interpersonal function of pain: Conserving multiple resources. *Pain*, *157*(4), 773-774

Vetter, I., Mozar, C. A., Durek, T., Wingerd, J. S., Alewood, P. F., Christie, M. J., & Lewis, R. J. (2012). Characterisation of Nav types endogenously expressed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology*, 83(11), 1562-1571.

Wang, Z. J., & Heinbockel, T. (2018). Essential oils and their constituents targeting the gabaergic system and sodium channels as treatment of neurological diseases. *Molecules*, 23(5), 1061.

Wang, Z. J., Tabakoff, B., Levinson, S. R., & Heinbockel, T. (2015). Inhibition of Na v 1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(7), 791.

Wendt, D. J., Starmer, C. F., & Grant, A. O. (1992). Na channel kinetics remain stable during perforated-patch recordings. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 263(6), C1234-C1240.

Worley, S. L. New directions in the treatment of chronic pain: national pain strategy will guide prevention, management, and research. *Pharmacy and Therapeutics*, 41(2), 107, 2016.

Yin, K., Baillie, G. J., & Vetter, I. (2016). Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Molecular pain*, 12, 1744806916646111.

Yprey, D. L., & Defelice, L. J. (2000). The patch-clamp technique explained and exercised with the use of simple electrical equivalent circuits. *Electrical Properties of Cells; Springer: Boston, MA, USA*, 7.