JOÃO LUIS CARVALHO DE SOUZA

**Análise do efeito inibitório do eugenol sobre
canais para Na⁺ ativados por voltagem em
neurônios sensitivos**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Cassola

São Paulo

2009

RESUMO

CARVALHO-DE-SOUZA, J. L. **Análise do efeito inibitório do eugenol sobre canais para Na⁺ ativados por voltagem em neurônios sensitivos.** 2009. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os efeitos inibitórios do eugenol (EUG) em canais para Na⁺ ativados por voltagem (Na_v) mostrados anteriormente não são totalmente compatíveis com nossos resultados. Nós estudamos os efeitos do EUG em correntes macroscópicas de Na⁺ e os comparamos aos da lidocaína, um anestésico local, para referência. O EUG bloqueou, rápida e reversivelmente, correntes de Na⁺ mistas (TTX-S+TTX-R) assim como as correntes de Na⁺ TTX-R. As IC₅₀ para a inibição das correntes mistas e TTX-R pelo EUG foram de 2,28 e 2,27 mmol/L, respectivamente. O bloqueio depende da frequência de despolarizações. Nas correntes mistas, o EUG desloca a curva de ativação para a direita, a de inativação para a esquerda, não altera a cinética de inativação e retarda a recuperação da inativação, rápida e lenta, dos canais. Nas correntes TTX-R, o efeito é semelhante, exceto na curva de ativação, que não é deslocada. Nós concluímos que o EUG bloqueia os Na_v por se ligar a estados conformacionais de repouso e inativados, rápido e lento. Os efeitos são semelhantes, mas não idênticos aos da lidocaína.

Palavras-chave: Eugenol. Canais de sódio. Correntes de sódio TTX-S. Correntes de sódio TTX-R.

ABSTRACT

CARVALHO-DE-SOUZA, J. L. **Analysis of the inhibitory effect of eugenol on voltage-gated Na⁺ channels of sensory neurons.** 2009. 101 p. PhD Thesis (Sciences – Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The previously described inhibitory effect of eugenol (EUG) on voltage-activated Na⁺ channels (Na_v) is not compatible with our results. We have studied the effects of EUG on macroscopic Na⁺ currents and compared them to the effects of lidocaine, a local anesthetic. EUG blocked both mixed (TTX-S and TTX-R) and TTX-R Na⁺ currents in a fast and reversible manner. The values of IC₅₀ for the inhibition of mixed and TTX-R currents were 2.28 and 2.27 mmol/L respectively. The blockade depends on frequency of depolarizing pulses. In mixed currents EUG displaced the activation curve to the right, the inactivation curve to the left, does not alter the inactivation kinetics and retards the recovery from inactivation, fast and slow, of the Na⁺ channels. In TTX-R currents, EUG effects were similar, except on the activation curve, which was not shifted. In conclusion, EUG blocks Na_v by binding to the resting and inactivated conformational states of channels, fast and slow. EUG effects resembles lidocaine ones, but are not identical.

Keywords: Eugenol. Sodium channels. TTX-S sodium currents. TTX-R sodium currents.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os fenilpropenos

Todas as partes de uma planta têm algum teor de essência aromática ou óleo essencial. Os óleos essenciais podem compor desde 0,5% do peso seco da planta até 14%, como é o caso dos botões florais da *Eugenia caryophyllata*, popularmente conhecida como cravo-da-índia. Os óleos essenciais, em mais de 95% de seu peso, são formados por diferentes fenilpropenos. A composição quantitativa dos óleos essenciais pode variar sazonalmente ou até mesmo circadianamente, o que ocorre principalmente pela interconversão dos fenilpropenos em isômeros ou em moléculas muito semelhantes.

Os óleos essenciais podem ser extraídos por arraste com vapor d'água, e um processo posterior de destilação fracionada pode ser utilizado para separar os diferentes fenilpropenos. A determinação precisa do percentual massa/volume de cada fenilpropeno em um óleo essencial pode ser determinada por cromatografia gasosa seguida da utilização de uma transformada de Fourier para separar os componentes do sinal cromatográfico. Pode-se utilizar ainda, técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para determinação dos percentuais de diferentes fenilpropenos em óleos essenciais (INOUE et al., 1976; ISIDOROV et al., 2001; VLACHOS et al., 2006).

Fenilpropenos são moléculas hidrofóbicas, de baixo peso molecular, presentes nas essências aromáticas de praticamente todas as plantas. Essas moléculas são sintetizadas nos tecidos das plantas, a partir do aminoácido fenilalanina, e armazenadas em vesículas ou mesmo na parede celular. Os fenilpropenos têm uma grande variedade de funções incluindo defesa contra bactérias, fungos e animais herbívoros, atração de insetos polinizadores e participação na sinalização intracelular (GANG et al., 2001; PICHERSKY et al., 2006). Na parede celular, essas moléculas funcionam como protetores das células contra a luz ultravioleta e como pigmento (HAHLBROCK e SCHEEL, 1989).

1.1.1 Aspectos físicos e químicos dos fenilpropenos

O ponto de fusão varia com a estrutura da molécula do fenilpropeno. Em geral os fenilpropenos são voláteis à temperatura ambiente. A cor amarelada e a densidade em torno de 1,0 g/mL são outras características físicas dos fenilpropenos. A análise química revela moléculas relativamente pequenas, com massa molar de 140 a 180 g. Os fenilpropenos possuem um anel aromático com algumas substituições, principalmente uma hidroxila e uma cadeia alifática insaturada substituindo hidrogênios do anel benzênico, o que lhes confere a denominação genérica de fenilpropenos.

1.2 Eugenol

1.2.1 Aspectos gerais

A síntese orgânica do eugenol (Figura 1) ocorre nas células vegetais a partir do aminoácido fenilalanina através de uma sequência de reações que supostamente têm como intermediários ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, aldeído coniferil, álcool coniferil e álcool diidroconiferil (GANG et al., 2001).

Figura 1. Estruturas químicas do eugenol e da lidocaína.

O eugenol é um dos fenilpropenos mais estudados. A primeira publicação indexada relativa a algum efeito atribuível ao eugenol ocorreu em 1948, em estudos a respeito de secreção gástrica (HOLLANDER e LAUBER, 1948).

O nome oficial do eugenol, segundo a IUPAC, é 2-metoxi-4-(2-propenil-fenol) (MORRISON e BOYD, 1961), com número de registro no CAS (Chemical Abstracts Service) de 97-53-0.

O eugenol é uma substância líquida amarelada à temperatura ambiente, com densidade de 1,07 mg/mL. Um contato prolongado do eugenol com o ar o torna mais viscoso e escurecido. Os pontos de fusão e ebulição são -9 e $+253$ °C, respectivamente. É totalmente miscível com clorofórmio, éter, gorduras e álcool etílico. É pouco solúvel em água pura, formando solução até a concentração de aproximadamente 200 $\mu\text{mol/L}$ (BUDAVARI, 1996).

Em contato com as mucosas é irritante e fortemente picante na mucosa oral. Seus odores fortes, pungentes, lembram o conhecido cheiro de cravo-da-índia usado na culinária como flavorizante. Na indústria de perfumaria e cosméticos, e de preparação de alimentos e bebidas, o eugenol é usado como antioxidante e flavorizante. É ainda usado para a síntese de vanilina de alta qualidade (CRAVEIRO et al., 1981; PRIEFERT et al., 2001).

1.2.2 Aspectos biológicos

O eugenol apresenta um espectro de atividades metabólicas incluindo potente modulação da enzima glutathione-S-transferase, interferindo nos níveis intracelulares de glutathione (BUDAVARI, 1996; ROMPELBERG et al., 1993), inibição da peroxidação lipídica (KABUTO et al., 2007; NAIDU, 1995) e atua como removedor de radicais hidroxila (TAIRA et al., 1992). Em fibroblastos da mucosa oral humana, em cultura, foi demonstrado que o eugenol promove diminuição da concentração intracelular de glutathione e de ATP e, por outro lado, inibe a peroxidação lipídica e o sistema xantina/xantina oxidase (JENG et al., 1994).

Atribui-se uma atividade antiinflamatória considerável ao eugenol. Dentre as evidências para essa atividade estão uma ação antiagregação plaquetária (CHEN et al., 1996), ação inibitória da expressão e nos efeitos da enzima ciclooxygenase-2 (KIM et al.,

2003) e ainda ação inibitória na via que ativa a transcrição do fator nuclear *kappa*-B (NFκB) (AGGARWAL e SHISHODIA, 2004).

O eugenol tem ação em miócitos. Em miócitos cardíacos, o eugenol bloqueia parte das correntes de Ca^{2+} e de K^{+} dependentes de voltagem, levando a um efeito inotrópico negativo sem modificar a atividade ATPásica da miosina (MAGYAR et al., 2004; SENSCH et al., 2000). Em miócitos de cães, o eugenol diminui a amplitude das correntes de Ca^{2+} por canais do tipo “L” ($\text{Ca}_v1.x$) sem alterar a sensibilidade à voltagem da ativação dessas correntes (DAMIANI et al., 2004).

Em células de músculo liso vascular o eugenol bloqueia correntes de Ca^{2+} ativadas por voltagem, e adicionalmente inibe a maquinaria contrátil. Tem ainda efeito vasodilatador por intermédio de liberação de óxido nítrico (NO) por células endoteliais (DAMIANI et al., 2003; HUME, 1983; LAHLOU et al., 2004; NISHIJIMA et al., 1999).

Em músculo esquelético, o eugenol diminui a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e em concentrações em torno de 8 mmol/L, contraditoriamente, induz contração muito provavelmente pelo aumento de liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (LEAL-CARDOSO et al., 1994).

As atividades antibacteriana e antifúngica do eugenol talvez tenham sido as primeiras atividades biológicas exploradas. Por sua ação antimicrobiana, o eugenol é utilizado em intervenções odontológicas temporárias (MAURICE et al., 1965). Além do efeito antimicrobiano, nessas circunstâncias, o eugenol exerce um efeito analgésico ainda pouco investigado.

Além dessa ação analgésica verificada na dentística, há também efeito anestésico geral, hipnótico e antidepressor verificado em ratos (DALLMEIER e CARLINI, 1981; DE MELLO et al., 1973; SELL e CARLINI, 1976). Essas atividades foram recentemente atribuídas a uma inibição competitiva da enzima monoaminoxidase (TAO et al., 2005). Ainda, o eugenol protegeu contra lesão células do sistema nervoso central em experimentos de perfusão após isquemia aguda experimental (GOMES, 2002).

Outros efeitos do eugenol em células neuronais foram estudados. A droga promove liberação de substância P por neurônios nociceptivos polimodais da polpa dentária e da medula espinhal (SHIBATA et al., 1994). Ainda, o eugenol exerce efeito nocipectivo por ativar uma via sensível ao bloqueio com capsazepina, um inibidor específico do receptor para capsaicina nos receptores vanilóides (“transient potential receptor vanilloid type 1”, TRPV1). A semelhança entre a molécula do eugenol e a da capsaicina favorece a hipótese

que o eugenol possa se ligar ao receptor para a capsaicina nesses canais (OHKUBO e SHIBATA, 1997).

Em neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) o eugenol estimula correntes de Ca^{2+} e de Cl^- . As correntes de Cl^- são provavelmente ativadas pelo aumento do Ca^{2+} intracelular, como efeito primário do eugenol. Esses efeitos foram apenas parcialmente bloqueados por capsazepina e ainda persistiram após a dessensibilização dos TRPV1, sugerindo que o efeito se dá por vias dependentes e independentes desses receptores (OHKUBO e KITAMURA, 1997). Em receptores vanilóides expressos heterologicamente em células HEK 293, o eugenol ativou uma corrente catiônica para dentro, similar àquela produzida pela capsaicina e totalmente bloqueada por capsazepina. Essa ativação de receptores TRPV1 também ocorreu em cultura primária de células do gânglio trigêmio (YANG et al., 2003).

O eugenol age nas membranas pré- e pós-sinápticas de neurônios. Foram descritos efeitos de bloqueio de correntes de Ca^{2+} , aumento do potencial de repouso (menos negativo), aumento da resistência de entrada e diminuição das respostas excitatórias à acetilcolina e ao glutamato, em concentrações do fenilpropeno abaixo de 1 mmol/L (SZABADICS e ERDELYI, 2000). Estudos recentes utilizando cultura primária de células do gânglio trigêmio e do GRD demonstraram que o eugenol, na concentração de 1 mmol/L, bloqueia correntes de Ca^{2+} ativadas por voltagem. O bloqueio das correntes se deu tanto em células sensíveis como nas insensíveis à capsaicina, sugerindo um efeito independente da ativação de receptores TRPV1. Foram atribuídos a um bloqueio direto dos canais para Ca^{2+} tipo “N”. Experimentos realizados em células C2D7 com expressão heteróloga estável do canal para Ca^{2+} tipo “N” humano, mostraram o efeito inibidor dessas correntes de Ca^{2+} pelo eugenol (LEE et al., 2005).

Misturas contendo eugenol, utilizadas para selamento de cavidades dentárias, modificam o potencial de ação de neurônios de *Helix aspersa*, *in vitro*. Pela técnica de registro intracelular do potencial de membrana, foi verificada diminuição da amplitude pico-a-pico da onda, da amplitude de pico, da magnitude da hiperpolarização pós-potencial e um aumento da duração do potencial de ação. Esses parâmetros são significativamente alterados após 80 minutos da adição das ligas contendo eugenol à solução da câmara de registros (ASGARI et al., 2003).

Nas concentrações entre 0,065 e 0,97 mmol/L, o eugenol bloqueia o disparo de potenciais de ação em nervo frênico e bloqueia a junção neuromuscular; ambos os efeitos são dependentes de concentração (BRODIN e ROED, 1984; OZEKI, 1975; SIEMONEIT

et al., 1966). O eugenol, a uma concentração de 0,8 mmol/L, abole rápida e reversivelmente o potencial de ação de fibras do tipo A, B e C em nervos isolados. A potência do bloqueio desses diferentes tipos de axônios pelo eugenol foi similar (BRODIN, 1985). O eugenol ainda reduz de maneira dependente de concentração a amplitude pico-a-pico do potencial de ação composto, assim como diminui a velocidade de propagação do potencial de ação em nervo ciático de rato isolado. Nesse estudo, 100 $\mu\text{mol/L}$ de eugenol diminui significativamente os parâmetros analisados e 600 $\mu\text{mol/L}$ bloqueou totalmente a geração de potenciais de ação (CRUZ, 2000). Todos esses efeitos foram atribuídos a um bloqueio de canais para Na^+ ativados por voltagem (Na_V) dos axônios estudados.

Em dissertação de mestrado, desenvolvida recentemente em nosso laboratório, mostramos o efeito inibitório do eugenol em Na_V expressos constitutivamente em neurônios GRD de ratos. O eugenol bloqueou correntes de Na^+ de forma rápida e completamente reversível. As correntes de Na^+ foram registradas em voltagem fixa (“voltage-clamp”) pela configuração “whole-cell” da técnica de “patch clamp” (CARVALHO-DE-SOUZA, 2005).

Estudos posteriores utilizando o eugenol mostraram seu efeito inibitório em correntes de Na^+ (PARK et al., 2006) e de K^+ (LI et al., 2007) registradas em neurônios sensitivos. Os dois trabalhos, entretanto, analisaram a fenomenologia do efeito e pouco do mecanismo pelo qual o eugenol bloqueia a corrente de Na^+ e de K^+ .

Recentemente foi publicado um trabalho (CHO et al., 2008) em que se analisam mecanismos de ação do eugenol sobre canais para Na^+ . Há, entretanto divergências fundamentais entre nossos resultados e os daquele grupo. As discrepâncias serão apontadas. Ainda mais, a análise que empreendemos dos mecanismos da ação inibitória e mais extensa e, em muitos aspectos, validada pela comparação entre efeitos do eugenol e da lidocaína (Figura 1), um anestésico local ao qual se devotou extensa análise eletrofisiológica.

1.3 Breve histórico sobre canais iônicos

No início da década de 80 o grupo do Dr. Masaharu Noda (NODA et al., 1984) determinou pela primeira vez a seqüência primária da proteína de uma canal para Na^+

dependente de voltagem. A proteína foi isolada da eletroplaca de *Electrophorus electricus*. Fragmentos da proteína foram seqüenciados diretamente para a posterior clonagem do cDNA, cujo seqüenciamento levou à determinação da seqüência primária da proteína. O perfil hidropático levou o grupo japonês a propor uma estrutura de quatro repetições para os canais para Na^+ , cada qual com seis segmentos transmembrana. Alguma dúvida houve antes de se supor que o quarto segmento de cada repetição estaria na membrana, pois neste segmento havia proporção considerável de aminoácidos hidrofílicos, carregados positivamente no pH fisiológico.

Os canais para Na^+ dependentes de voltagem (Na_v) são responsáveis pelo aumento da permeabilidade a Na^+ dependente de voltagem, que inicia os potenciais de ação na membrana de neurônios e da maioria das células eletricamente excitáveis, como células musculares e endócrinas (HILLE, 2001). A diferença de potencial elétrico na membrana determina a probabilidade de abertura desses canais que, quando abertos, permitem fluxo eletrodifusional apenas de Na^+ .

O primeiro registro de corrente passando por um único canal iônico foi feito no final da década de 1970 pelo grupo do Dr. Erwin Neher (HAMILL et al., 1981).

1.3.1 Nomenclatura e genealogia das subunidades α de canais para Na^+ dependentes de voltagem

Os canais para Na^+ são complexos protéicos formados por uma subunidade α e uma ou mais subunidades β . Apenas a expressão da subunidade α , constituída por cerca de 2000 aminoácidos, com cerca de 260 kDa, é suficiente para gerar canais para Na^+ dependentes de voltagem funcionantes. As subunidades β , coexpressas com as subunidades α dos canais para Na^+ , têm em torno de 220 aminoácidos e 40 kDa e são apenas regulatórias, não fazendo parte do poro propriamente (Figura 1) (SCHREIBMAYER et al., 1994).

Desde a primeira publicação da seqüência primária da subunidade α da proteína formadora do canal para Na^+ pelo grupo do Dr. Numa (NODA et al., 1984), multiplicaram-se as informações sobre seqüências primárias de subunidades α de canais para Na^+ dependentes de voltagem, em uma mesma espécie ou em espécies diferentes. Cada

laboratório identificava a proteína descrita por nomes escolhidos com certo grau de arbitrariedade, criando-se um quadro confuso. As diversas proteínas que formavam canais para Na^+ assemelhavam-se notavelmente na seqüência primária. A necessária sistematização da nomenclatura e o estabelecimento da filogenia veio em 2000 (GOLDIN et al., 2000). O padrão de nomenclatura estendeu-se a outros canais, além dos canais para Na^+ , dependentes de voltagem ou não. Assim a identificação é feita pelo símbolo do elemento químico ao qual o canal é seletivo, seguido por um subscrito que identifica o principal controlador do “gating” do canal. $\text{Na}_v1.1$ portanto, identifica os canais para Na^+ (Na) dependentes de voltagem (v). Em seguida vem um número que descreve a classe filogenética, denominada subfamília (Na_v1 , por exemplo). O número depois do ponto designa a ordem cronológica de descrição da estrutura da proteína (por exemplo, $\text{Na}_v1.1$). Havendo isoformas que sejam produtos de um mesmo gene, por *splicing* alternativo, faz-se a identificação por aposição de uma letra.

1.3.2 Filogenia das subunidades α de canais para Na^+

Atualmente há em humanos nove genes que codificam subunidades α de canais para Na^+ . Nove delas formam canais funcionais. O alinhamento das regiões mais conservadas das proteínas que formam os canais para Na^+ de humanos evidencia as relações filogenéticas. O gráfico, denominado dendrograma, mostrado na Figura 2, indica homologia das seqüências, e o grau de identidade indica que pertençam a uma única família ($\text{Na}_v1.x$)

Figura 2. Dendrograma mostrando o resultado do alinhamento de parte das seqüências de aminoácidos das nove subunidades α de Na_v de ratos. A distância entre duas subunidades quaisquer é proporcional à distância filogenética. Para a construção do dendrograma alinharam-se as alças que atravessam a membrana das quatro repetições e a alça citoplasmática que conecta as repetições III e IV de cada proteína [Retirado de (GOLDIN et al., 2000)].

1.3.3 Estrutura dos canais para Na^+ ativados por voltagem

1.3.3.1 A subunidade α

A topologia das subunidades α na membrana, deduzida do perfil hidropático e confirmada por outras evidências experimentais, é mostrada na Figura 3. A subunidade α contém quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos em α -hélice, atravessando a membrana (S1-S6), representados na Figura como cilindros numerados de 1 a 6, conectados por alças intra e extracelulares. Entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio há alças reentrantes (alça “P”) que formam juntas o vestíbulo extracelular e o filtro de seletividade do canal. Há muitas evidências de que o filtro de seletividade é formado por dois cinturões de aminoácidos na estrutura tridimensional do canal: um mais intracelular, DEKA (asp–glu–lys–ala) e outro mais extracelular EEDD (glu–glu–asp–asp), como mostrado na Figura 3. Os aminoácidos de cada cinturão estão na alça “P” de cada

repetição da subunidade α . O cinturão mais intracelular (DEKA) pode ser considerado como assinatura dos canais para Na^+ dependentes de voltagem, já que esses aminoácidos nessas posições são altamente conservados nessas proteínas (HEINEMANN et al., 1992).

Na subunidade α estão os “gates” de ativação e de inativação. Os segmentos S4 de cada repetição contém até 8 aminoácidos básicos, lisina e arginina, protonados no pH fisiológico e, portanto, com cargas positivas. Como estão dispostos no campo elétrico de membrana, estes domínios funcionam como sensores de voltagem, determinando as probabilidades das conformações de repouso e aberta do canal. A alça entre os domínios III e IV contém a sequência IFM, que constitui o “gate” de inativação rápida (CATTERALL, 2000).

Figura 3. Subunidades constitutivas de canais para Na^+ dependentes de voltagem (CATTERALL, 2000).

Na travessia do poro a maior interação físico-química entre íons e proteína se dá na região do filtro de seletividade. Estas interações discriminam os íons e conferem seletividade ao canal. Se se aplica aos canais para Na^+ o modelo bem investigado para o KcsA (DOYLE et al., 1998), a interação envolve energia de hidratação do íon. Na região do filtro, com geometria definida, haveria oxigênios com os quais os Na^+ poderiam interagir, trocando a interação com o oxigênio da HOH na solução, em condição de equivalência energética. No canal para Na^+ a geometria do filtro asseguraria equivalência energética apenas para o Na^+ .

Muitos esforços foram envidados na determinação da estrutura tridimensional (3D) dos canais para Na^+ dependentes de voltagem. Estruturas 3D com resolução atômica ($\sim 2\text{\AA}$) são conseguidas com espectroscopia de Raio X. Nesta técnica, para se ter padrões de difração com informação suficiente para a reconstrução tridimensional, é necessária a cristalização da proteína, o que não é trivial se se trata de proteínas de membrana, de alto peso molecular. O melhor que se tem conseguido é a estrutura 3D de pequenos domínios da proteína. Outras técnicas de imagem de moléculas foram empregadas com o intuito de determinar a estrutura 3D dos canais para Na^+ . Sato e colaboradores, utilizando microscopia eletrônica, determinaram a estrutura dessas proteínas com uma resolução de $19\text{\AA}$ (SATO et al., 2001). A estrutura 3D do canal para Na^+ dependente de voltagem de *Electrophorus electricus*, nesta resolução, se assemelha a um sino com $135\text{\AA}$ de altura e 100 e $65\text{\AA}$ de largura, na base e no topo, respectivamente.

1.3.3.2 As subunidades β

As subunidades β têm apenas um segmento transmembrana, uma cauda C- terminal intracelular curta e um grande domínio extracelular, N- terminal, com estrutura em folha β , semelhantes aos de imunoglobulinas.

As subunidades β , além de modular a atividade do canal e participar no processo de inativação, podem interagir com proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular, determinando a distribuição dos canais em tecidos ou mesmo em regiões de membrana específicas como o nodo de Ranvier, o cone de implantação axonal e túbulos “T” de músculo esquelético (MORGAN et al., 2000; YU et al., 2003). A interação da subunidades β com uma subunidade α pode ser covalente, como é o caso das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$, ou covalente, por pontes dissulfeto, nos casos das subunidades $\beta 2$ e $\beta 4$ (HARTSHORNE et al., 1982; ISOM et al., 1992). O arranjo da subunidade α com uma ou mais subunidades β depende dos tipos de subunidades envolvidas. Por exemplo, a interação tanto da porção intracelular quanto da extracelular da subunidade $\beta 1$ com a subunidade α , expressas em cardiomiócitos ($\text{Na}_v 1.5$), são necessárias para acelerar a recuperação da inativação desses canais (ZIMMER e BENNDORF, 2002). Por outro lado, apenas a região extracelular de $\beta 1$ é necessária para acelerar a inativação de Na_v expressos em músculo esquelético, ($\text{Na}_v 1.4$)

(CHEN e CANNON, 1995; MCCORMICK et al., 1999). As subunidades β de canais para Na^+ dependentes de voltagem são recentes evolutivamente, pois são encontradas apenas em vertebrados.

1.3.4 Distribuição dos Na_V nos tecidos

Em mamíferos, os Na_V são expressos em praticamente todas as células excitáveis como músculos lisos e esqueléticos, neurônios e células endócrinas. Contudo a expressão das isoformas das subunidades α e β é peculiar nos fenótipos celulares. A Tabela 1 relaciona as subunidades α e β de Na_V em ratos, e os tecidos nos quais são expressas (CATTERALL et al., 2005; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Tabela 1. Subunidades α e β de Na_V de ratos.

Nome do canal (subunidade α)	Subunidades β associadas	Tecido	Gene (subunidade α)	Acesso ao banco de genes
$\text{Na}_V1.1$	$\beta1, \beta2, \beta3$ e $\beta4$	SNC, SNP	<i>SCN1A</i>	X03638
$\text{Na}_V1.2$	$\beta1, \beta2, \beta3$ e $\beta4$	SNC	<i>SCN2A</i>	X03639
$\text{Na}_V1.3$	$\beta1$ e $\beta3$	SNC*	<i>SCN3A</i>	Y00766
$\text{Na}_V1.4$	$\beta1$	músculo esquelético	<i>SCN4A</i>	M26643
$\text{Na}_V1.5$	$\beta1, \beta2, \beta3$ e $\beta4$	músculo esquelético desnervado e coração	<i>SCN5A</i>	M27902
$\text{Na}_V1.6$	$\beta1$ e $\beta2$	SNC, SNP	<i>SCN8A</i>	L36018
$\text{Na}_V1.7$	$\beta1$ e $\beta2$	SNP	<i>SCN9A</i>	AF000368
$\text{Na}_V1.8$	desconhecido	SNP (GRD)	<i>SCN10A</i>	X92184
$\text{Na}_V1.9$	desconhecido	SNP	<i>SCN11A</i>	AJ237852

*Expresso preferencialmente em tecidos embrionários; SNC = Sistema Nervoso Central; SNP = Sistema Nervoso Periférico; GRD = Gânglio da Raiz Dorsal (CATTERALL et al., 2005).

As várias subunidades α de Na_V formam canais com diferenças quantitativas nas propriedades biofísicas, como por exemplo a diferença de potencial característica na qual a probabilidade de abertura é de 0,5 ($V_{0,5}$) e a constante de tempo da inativação das correntes (τ_h). Há duas subunidades, $\text{Na}_V1.8$ e $\text{Na}_V1.9$, que têm $V_{0,5}$ marcadamente menos negativos e τ_h maior que as demais. Por essa última característica elas são denominadas correntes lentas (de inativação lenta).

Farmacologicamente, as diferentes subunidades α de Na_V podem ser discriminadas por sua sensibilidade à tetrodotoxina (TTX), uma toxina encontrada no peixe baiacu, que

bloqueia os canais. As subunidades $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$ são ditas sensíveis à TTX (TTX-S) por se ligarem à toxina em concentrações na faixa alguns nanomolares; $\text{Na}_v1.8$ e $\text{Na}_v1.9$ se ligam à TTX em concentrações de dezenas de micromolares e portanto são chamadas de resistentes à TTX (TTX-R).

Um mesmo fenótipo celular pode expressar diferentes subunidades de Na_v . Assim, obviamente, a combinação de subunidades com diferentes cinéticas determina formas de onda variáveis para os potenciais de ação de uma célula.

1.3.5 A condutância a Na^+ por canais dependentes de voltagem.

1.3.5.1 Condutância macroscópica: O modelo de Hodgkin e Huxley

Em 1952, no último de uma série de quatro trabalhos publicados, sobre os mecanismos iônicos do potencial de ação, Hodgkin e Huxley propuseram modelo (modelo HH) para a descrição das variações das condutâncias da membrana plasmática a Na^+ e a K^+ , associadas ao potencial de ação, depois de exaustiva análise fenomenológica com a técnica de “voltage clamp”. O modelo permitiu a derivação de equações diferenciais parciais para a descrição da cinética e dependência de voltagem das condutâncias. Soluções numéricas das equações simulava com fidedignidade o fenômeno do potencial de ação.

Para descrever a ativação e a inativação da condutância macroscópica a Na^+ o modelo HH supunha “partículas comportas” (“gating particles”) para ativação e outras para a inativação. A probabilidade de as partículas de ativação estarem no estado permissivo era “ m ” ($0 \leq m \leq 1$). Obviamente, a probabilidade de encontrá-las no estado não permissivo era “ $1 - m$ ”. O equilíbrio entre os estados era determinado pela diferença de potencial elétrico na membrana. Para mudanças instantâneas no potencial de membrana modificava-se o equilíbrio entre estados. A relaxação seguia cinética de primeira ordem, com constante de velocidade definida empiricamente. Nas hiperpolarizações “ m ” tendia para zero, e para um nas despolarizações. A inativação era dada por “partículas” de inativação. A probabilidade do estado permissivo destas era dada por “ h ”, variando de zero

a um. A probabilidade do “gate” de inativação encontrar-se no estado não permissivo era dada por “ $1 - h$ ”. A probabilidade de “ h ” tende para um nas hiperpolarizações e para zero nas despolarizações e o valor de “ h ” é determinado pela voltagem. Para uma modificação abrupta da diferença de potencial elétrico de membrana, a probabilidade “ h ” relaxa para novo valor segundo uma cinética de primeira ordem. As constantes de velocidade são determinadas empiricamente. Para este modelo foram escritas equações diferenciais parciais, cujas soluções numéricas deveriam se superpor às variações observadas na condutância da membrana ao Na^+ quando se modificava o potencial de membrana. Como as cinéticas das transições das “partículas” era exponencial, o melhor ajuste das equações aos pontos ocorreu ao se supor 3 partículas de ativação. Portanto, a condutância a Na^+ era dada por (equação 1):

$$G_{\text{Na}^+}^V = G_{\text{Na}^+}^{\text{max}} \times m^3 h \quad (1)$$

onde $G_{\text{Na}^+}^V$ é a condutância a Na^+ instantânea, $G_{\text{Na}^+}^{\text{max}}$ é a condutância máxima a Na^+ e $m^3 h$ é a probabilidade de abertura do canal.

Havendo despolarização o valor da probabilidade m aumentava, com cinética exponencial e rápida. Três partículas de ativação simultaneamente no estado permissivo eram necessárias. Daí a probabilidade ao cubo. Em potenciais hiperpolarizados a probabilidade h tendia para 1. Ocorrendo a despolarização, “ h ” tende para zero. Todavia a cinética da modificação de “ h ” é mais lenta que a de modificação de “ m ”, de forma que o produto $m^3 h$, depois da despolarização rapidamente crescia, decrescendo em seguida, tendendo a zero. Esta é também a cinética da condutância.

Em um potencial de membrana despolarizado o estado inativado da condutância é estável. A recuperação do estado de repouso, desde o qual a condutância pode de novo se ativar, depende da repolarização. A cinética com a qual a condutância se recupera da inativação é bem mais lenta. A recuperação da inativação é um dos principais determinantes dos períodos refratários, que estabelecem o limite superior para a frequência de disparo dos potenciais de ação.

Em despolarizações prolongadas a condutância da Na^+ dependente de voltagem pode entrar em um segundo estado de inativação. Como o faz com cinética muito lenta, este estado foi denominado inativação lenta, contrastando-o com o estado descrito

anteriormente, que é designado de inativação rápida. A recuperação da condutância desde este estado de inativação lenta dá-se com cinética lenta.

1.3.5.2 *Eventos unitários da condutância a Na^+ : canais*

Como já se discutiu acima, a condutância a um dado íon é conferida à membrana celular por canais. Estes são formados na membrana por agregados de proteínas, arranjadas em estrutura quaternária. No caso dos canais para Na^+ , a subunidade que forma canais seletivos, sensíveis a voltagem, com múltiplos estados, entre eles a inativação, é a α . Vários genes codificam proteínas que são as subunidades alfa dos canais nos vertebrados. As várias proteínas são homólogas.

Os canais operam estocasticamente. Alguns estados da proteína, biofisicamente relevantes, ocorrem com certa probabilidade e correspondem a conformações estáveis em escala de tempo de ms. Assim, por exemplo, há estados da proteína no qual o poro, por onde passam os íons, não está aberto, correspondendo ao que se chama de estado de repouso ou fechado, outro em que o poro é condutivo, que corresponde ao estado aberto, e estado em que o poro está bloqueado, condição em que o canal está inativado. A transição entre os estados é muito rápida, de forma que, para a resolução atual dos sistemas de registro o comportamento dos canais é binário: condutivo/não condutivo, ou aberto/fechado. A condutância unitária varia entre zero e um valor determinado pelas condições de observação (mormente concentração do íon permeante, em ambas as soluções), sem valores intermediários.

A probabilidade dos estados está, direta ou indiretamente, determinada pelo campo elétrico na membrana celular. A probabilidade do estado aberto dos canais (P_o), a densidade dos canais (N) e condutância de cada um deles (g_c) determinam a condutância macroscópica da membrana ao íon. No caso do Na^+ (equação 2):

$$G^{\text{Na}^+} = N^{\text{Na}^+} \times P_o^{\text{Na}^+} \times g_c^{\text{Na}^+} \quad (2)$$

onde G^{Na^+} é a condutância macroscópica a Na^+ , N^{Na^+} é a densidade de canais para Na^+ , $P_o^{Na^+}$ é a probabilidade de abertura dos canais para Na^+ e $g_c^{Na^+}$ é a condutância unitária dos canais a Na^+ .

A determinação da probabilidade de um estado pelo campo elétrico de membrana implica que exista, na proteína, um sensor de voltagem. Os segmentos S4 de cada domínio da subunidade α , que contém cada um cinco a oito resíduos de arginina e lisina formam o sensor de voltagem. Os segmentos S1, S2 e S3 de cada repetição contêm cargas negativas distribuídas que funcionam como anuladores do campo elétrico gerado pelas cargas dos S4, já que em um ambiente hidrofóbico, de constante dielétrica baixa, a presença exclusiva de cargas positivas, em S4, tornaria instável a estrutura molecular (NODA et al., 1984). Uma das hipóteses considera que o segmento S4 desliza helicoidalmente, em ângulo reto com o plano da membrana, num trilho molecular formado por outras partes da proteína. O deslocamento de todos os quatro segmentos S4 para o lado extracelular da membrana é condição para a abertura do canal e constituem o processo de “gating” do canal (CATTERALL, 2000).

Os segmentos S4 oscilam térmica e independentemente e podem assumir basicamente duas posições, energeticamente favorecidas, uma delas onde a α -hélice está deslocada para o lado intracelular (posição mais estável quando a membrana está hiperpolarizada), e outra quando esta está deslocada para o lado extracelular (mais favorável durante despolarizações). Intermediários entre esses dois estados não são detectados pela sua meia-vida muito curta.

Dados obtidos em estudos com canais para K^+ dão pistas de o que é, ou são, fisicamente o(s) “gate(s)” de ativação do canal. Em canais para K^+ os “gates” se constituem nos segmentos S6, ou M2, de cada proteína. Esses segmentos tem uma glicina, aproximadamente no meio da membrana, que acaba funcionando como uma “dobradiça” na α -hélice. Essa “dobradiça” permite que a metade mais citoplasmática desse segmento, que forma as paredes do poro nessa região, oscile entre uma posição mais afastada e mais próxima do eixo central do poro, fazendo com que este se abra ou se feche (JIANG et al., 2002). Assim a posição do segmento M2, em canais para K^+ tipo 2TM, ou analogamente do segmento S6, em canais do tipo 6TM ou 24TM pode ser controlada por diversos fatores, dando o processo de “gating” do canal. Nos canais dependentes de voltagem como

os Na_V , a posição do sensor de voltagem determina a probabilidade da posição de cada segmentos S6 de cada domínio, determinando a abertura do canal.

Inativação é a expressão que descreve a redução na condutância da membrana a Na^+ nos Na_V , mesmo que mantida a despolarização que promoveu a ativação. No canal unitário a inativação rápida resulta em um estado não-condutivo estável. O modelo para a inativação, largamente comprovado, é o da corrente-bola (BEZANILLA e ARMSTRONG, 1977). A alça que conecta as repetições III e IV da proteína contém uma tríade de aminoácidos hidrofóbicos IFM (ile – phe – met) que forma a “bola”. Esta alça, que não tem uma estrutura tridimensional bem definida, presa aos domínios (“corrente”), oscila termicamente e pode se ligar com afinidade elevada a um sítio no vestíbulo intracelular do canal, exposto ou que se forma quando este está no estado aberto (GUY e SEETHARAMULU, 1986; KELLENBERGER et al., 1997). O receptor para a tríade IFM provavelmente está nas porções citoplasmáticas dos segmentos S4 e S5 da repetição III (SMITH e GOLDIN, 1997), nos segmentos S4 e S5 da repetição IV (MCPHEE et al., 1998) e nos segmentos S6 das quatro repetições (WANG et al., 2003; YAROV-YAROVY et al., 2002). Portanto, no estado inativado os “gates” de ativação estão em posição correspondente ao canal aberto, porém o poro está ocluído no vestíbulo citoplasmático pela tríade de aminoácidos.

Há ainda um segundo estado na inativação dos Na_V , que chamamos inativação lenta, que aparece também em canais para K^+ dependentes de voltagem (LIU et al., 1996; ONG et al., 2000). Este tipo de inativação é um processo separado daquele que envolve a tríade de aminoácidos IFM, que chamamos inativação rápida. Uma das hipóteses para esse tipo de inativação é a de um rearranjo do poro (ONG et al., 2000). Entretanto há controvérsias a respeito do processo de inativação lenta. A hipótese mais aceita é a de que o próprio poro do canal colapsa com despolarizações longas. Outros estudos negam que haja modificações na conformação do poro após a instalação da inativação lenta (STRUYK e CANNON, 2002). Finalmente outros estudos mostram que alguns aminoácidos em regiões específicas da proteína, como o segmento S4 do domínio IV (MITROVIC et al., 2000), os segmentos S5 e S6 do domínio II (VILIN et al., 2001) e o segmento S6 do domínio II (O'REILLY et al., 2001) estão envolvidos com a inativação lenta, corroborando a idéia do colabamento do poro.

1.3.5.3 *Recuperação da inativação*

A recuperação da inativação se dá com a repolarização da membrana. Nos potenciais negativos da membrana celular os segmentos S4 tendem à posição de repouso, determinando conformações nas quais a afinidade do sítio de ligação do poro com a tríade IFM decai, a “bola” libera o poro, agora na conformação fechado, de repouso (ARMSTRONG, 2006).

1.3.6 *Modelos cinéticos mais complexos para o Na_v*

O modelo cinético de três estados, fechado ("C", do inglês “closed”), aberto ("O", do inglês “open”) e inativado ("I", do inglês “inactivated”), para os canais para Na⁺ ativados por voltagem, suficiente para a análise de muitas das observações, é reconhecidamente simplificado. Modelos mais complexos, necessários à explicação de outros fenômenos, supõem pelo menos 19 estados (ARMSTRONG, 2006), entre os quais 14 são estados não condutivos (fechados, "C"), 2 são estados condutivos (abertos, "O") e os 3 restantes são estados não condutivos relacionados à conformação inativada (inativados, "I"). Este modelo de Armstrong não considera a inativação lenta dos canais.

Mais simples e suficiente para a análise de algumas observações, incluídas as que são aqui apresentadas, é o modelo cinético proposto por Armstrong e Bezanilla em 1977 (ARMSTRONG e BEZANILLA, 1977). Neste modelo há cinco estados correspondentes ao canal fechado, um estado aberto e dois estados inativados.

O modelo da Figura 4, que utilizamos para a interpretação dos resultados considera vários estados fechados dos canais ("C₀" e "C_n"), um estado aberto ("O") e dois estados inativados ("I_f" e "I_s"); “f” do inglês “fast”, e “s” do inglês “slow”). "C₀" representa os canais fechados em voltagens mais negativas que -110 mV, nas quais os segmentos S4 dos quatro domínios estão na posição de repouso. "C_n" representa os estados nos quais um, dois ou três, mas não os quatro segmentos S4, encontram-se na posição “ativada”. Os canais para Na⁺ podem estar, com uma dada probabilidade, em cada um destes estados nas voltagens entre -110 e a voltagem na qual todos os “gates” estão “ativados”, conformação esta que está em equilíbrio com "O". "I_f" representa o estado inativado no qual os canais

rapidamente entram após a abertura. Essa inativação está relacionada com a tríade de aminoácidos IFM. "I_s" representa estados não condutivos, lentamente acessíveis nas despolarizações prolongadas.

Figura 4. Esquema de estados conformacionais dos canais para Na⁺ dependentes de voltagem. "C₀", Na_V fechados com os quatro sensores de voltagem na posição de "repóuso"; "C_n", Na_V fechados com 1 a 3 sensores de voltagem na posição "ativada"; "O" Na_V na conformação aberta; "I_f", Na_V no subestado de inativação rápida; "I_s", Na_V no subestado de inativação lenta; ΔV_m, despolarização; Δt, tempo decorrido. Da conformação "C_n", os Na_V podem assumir a conformação "I_f", de acordo com o tempo (ver detalhes no texto).

1.3.7 Farmacologia dos Na_V

Substâncias com efeitos sobre canais para Na⁺ fazem-no principalmente por se ligarem principalmente à subunidade α dos canais. Algumas se ligam a sítios extracelulares, próximos ao poro e o obstruem, bloqueando o fluxo de íons pelo canal. Outras ligam-se a sítios específicos e modificam o processo de "gating" do canal, de ativação ou de inativação.

1.4 Anestésicos locais

Os anestésicos locais formam uma classe importante de moléculas inibidoras dos Na_v . Essas moléculas se agrupam em duas classes de compostos químicos a saber: os amino ésteres, como a cocaína, a procaína, a benzocaína e a tetracaína; e os amino amidas, como a lidocaína, a mepivacaína, a bupivacaína e a etidocaína. A lidocaína, conhecida comercialmente como xilocaína®, é hoje o anestésico local mais utilizado na clínica médica humana e veterinária. A lidocaína surgiu como um derivado mais potente da cocaína, na ação anestésica local, e foi sintetizada pela primeira vez em 1943 por Nils Löfgren e Bengt Lundqvist.

Os anestésicos locais são moléculas que se ligam reversivelmente aos Na_v , bloqueando a passagem de íons Na^+ através de seu poro. O bloqueio dos Na_v de neurônios pelos anestésicos locais impedem a geração de potenciais de ação e portanto abolem a excitabilidade neuronal. Sem potenciais de ação, um neurônio não transmite informações, como por exemplo de dor, da periferia para o sistema nervoso central, onde é gerada a sensação.

O sítio de ligação de anestésicos locais está no vestíbulo intracelular do canal; portanto o anestésico local age pela lado intracelular e tem de penetrar na célula para exercer o efeito. A penetração se dá por difusão simples pela membrana celular. Os segmentos S6 de pelo menos três dos quatro domínios da proteína do canal estão envolvidos no sítio receptor para os anestésicos locais (CATTERALL, 2000). Ainda, alostericamente, o movimento do segmento S4 do domínio III é inibido pela lidocaína e o do domínio IV é estabilizado na posição deslocada para fora da célula, predominante na despolarização (SHEETS e HANCK, 2005; SHEETS e HANCK, 2003).

O bloqueio de correntes de Na^+ pela lidocaína tem algumas características marcantes. Uma delas é o bloqueio dependente de frequência, o que confere à lidocaína propriedades antiarrítmicas em tecido cardíaco. Esse bloqueio se caracteriza por um aumento do bloqueio fracional dos Na_v quando a frequência de despolarizações é aumentada. No caso do tecido cardíaco, a lidocaína não funciona como anestésico local, mas sim como um antiarrítmico (BEAN et al., 1983). Esse bloqueio adicional pelo aumento da frequência de despolarizações se deve ao fato de os canais estarem mais tempo na conformação aberta ou inativada, e a lidocaína parece ter maior afinidade por esses estados do que pelo estado de repouso (RAGSDALE et al., 1994).

1.4.1 A hipótese do receptor modulado (bloqueio dependente de estado) para anestésicos locais

De acordo com a hipótese do receptor modulado, os anestésicos locais interagem ligam-se aos três estados funcionais do canal – repouso, aberto, inativado – com diferentes constantes de atividade (HILLE, 1977; HONDEGHEM e KATZUNG, 1977; KHODOROV, 1991). O bloqueio dependente de estado reflete um mecanismo alostérico que modula a afinidade do receptor pelo anestésico: a afinidade do receptor é baixa quando o canal está no estado de repouso e se eleva quando o canal passa ao estado aberto ou inativado.

1.5 Justificativa para o estudo

Como explicado anteriormente, o eugenol se liga a canais para Na^+ dependentes de voltagem através de um mecanismo ainda não muito claro, considerando o conhecimento acumulado e disponível para acesso nos bancos de dados relacionados. Considerando que a lidocaína bloqueia canais para Na^+ por mecanismos já razoavelmente conhecidos, nós decidimos estudar os efeitos inibitórios do eugenol sobre canais para Na^+ dependentes de voltagem à luz do que se conhece a respeito dos efeitos da lidocaína nesses canais.

6 CONCLUSÕES

1) Eugenol se liga aos diferentes subestados dos Na_v com diferentes afinidades. A afinidade do eugenol aos subestados fechados aumenta com a despolarização, sendo a possível ligação a subestados fechados mais próximos do subestado aberto, " C_n ", importante para o efeito em voltagens em torno de -60 mV,

2) O efeito bloqueador do eugenol é semelhante ao da lidocaína, mas possivelmente há uma diferença marcante na ligação aos subestados " C_n ",

3) Tanto o eugenol como a lidocaína se ligam ao subestado " I_s " dos Na_v .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1030, p. 434-441, 2004.
- ARMSTRONG, C. M. Na channel inactivation from open and closed states. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 47, p. 17991-17996, 2006.
- ARMSTRONG, C. M.; BEZANILLA, F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. **J. Gen. Physiol.**, v. 70, n. 5, p. 567-590, 1977.
- ASGARI, S.; JANAHMADI, M.; KHALILKHANI, H. Comparison of neurotoxicity of root canal sealers on spontaneous bioelectrical activity in identified Helix neurones using an intracellular recording technique. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 12, p. 891-897, 2003.
- BEAN, B. P.; COHEN, C. J.; TSIEN, R. W. Lidocaine block of cardiac sodium channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 81, n. 5, p. 613-642, 1983.
- BEZANILLA, F.; ARMSTRONG, C. M. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. **J. Gen. Physiol.**, v. 70, n. 5, p. 549-566, 1977.
- BLACK, J. A.; LIU, S.; TANAKA, M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. **Pain**, v. 108, n. 3, p. 237-247, 2004.
- BRODIN, P. Differential inhibition of A, B and C fibres in the rat vagus nerve by lidocaine, eugenol and formaldehyde. **Arch. Oral Biol.**, v. 30, n. 6, p. 477-480, 1985.
- BRODIN, P.; ROED, A. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. **Arch. Oral Biol.**, v. 29, n. 8, p. 611-615, 1984.
- BUDAVARI, S. **The Merck Index**. Rahway, N.J.: Merck & Co. Inc., 1996.
- CAFFREY, J. M.; ENG, D. L.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G.; KOCSIS, J. D. Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res.**, v. 592, n. 1-2, p. 283-297, 1992.
- CARVALHO-DE-SOUZA, J. L. **Eugenol inibe correntes de Na⁺ dependentes de voltagem em gânglio da raiz dorsal de ratos**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2005.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR: 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CATTERALL, W. A. Common modes of drug action on Na⁺ channels: local anesthetics, antiarrhythmics and anticonvulsants. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 57-65, 1987.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13-25, 2000.

CATTERALL, W. A.; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 4, p. 397-409, 2005.

CESTELE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 883-892, 2000.

CHEN, C.; CANNON, S. C. Modulation of Na⁺ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. **Pflugers Arch.**, v. 431, n. 2, p. 186-195, 1995.

CHEN, S. J.; WANG, M. H.; CHEN, I. J. Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 629-633, 1996.

CHO, J. S.; KIM, T. H.; LIM, J. M.; SONG, J. H. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res.**, v. 1243, p. 53-62, 2008.

COLE, K. S. **Membranes, Ions and Impulses. A Chapter of Classical Biophysics.** Berkeley: University of California, 1968.

CRAVEIRO, A. C.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza, CE: Edições UFC, 1981.

CRUZ, G. M. **Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial de ação composto em nervo ciático de rato.** 95 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2000.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 113-127, 1981.

DAMIANI, C. E.; MOREIRA, C. M.; ZHANG, H. T.; CREAZZO, T. L.; VASSALLO, D. V. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 44, n. 6, p. 688-695, 2004.

DAMIANI, C. E.; ROSSONI, L. V.; VASSALLO, D. V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascul. Pharmacol.**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 2003.

DE MELLO, A. C.; CARLINI, E. A.; DRESSLER, K.; GREEN, J. P.; KANG, S.; MARGOLIS, S. Behavioral observations on compounds found in nutmeg. **Psychopharmacologia**, v. 31, n. 4, p. 349-363, 1973.

DOYLE, D. A.; MORAIS, C. J.; PFUETZNER, R. A.; KUO, A.; GULBIS, J. M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science**, v. 280, n. 5360, p. 69-77, 1998.

GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K. H.; SIMON, J. E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiol.**, v. 125, n. 2, p. 539-555, 2001.

GOLDIN, A. L.; BARCHI, R. L.; CALDWELL, J. H.; HOFMANN, F.; HOWE, J. R.; HUNTER, J. C.; KALLEN, R. G.; MANDEL, G.; MEISLER, M. H.; NETTER, Y. B.; NODA, M.; TAMKUN, M. M.; WAXMAN, S. G.; WOOD, J. N.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000.

GOMES, R. C. L. **Avaliação eletrofisiológica da ação citoprotetora do eugenol em cérebro de ratos submetidos a isquemia.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.

GUY, H. R.; SEETHARAMULU, P. Molecular model of the action potential sodium channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, n. 2, p. 508-512, 1986.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoids Metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 40, p. 347-369, 1989.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch.**, v. 391, n. 2, p. 85-100, 1981.

HARTSHORNE, R. P.; MESSNER, D. J.; COPPERSMITH, J. C.; CATTERALL, W. A. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 23, p. 13888-13891, 1982.

HEINEMANN, S. H.; TERLAU, H.; STUHMER, W.; IMOTO, K.; NUMA, S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. **Nature**, v. 356, n. 6368, p. 441-443, 1992.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes.** Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, 2001.

HILLE, B. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. **J. Gen. Physiol.**, v. 69, n. 4, p. 497-515, 1977.

HOLLANDER, F.; LAUBER, F. U. Eugenol as a stimulus for gastric mucous secretion. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 67, n. 1, p. 34-37, 1948.

HONDEGHEM, L. M.; KATZUNG, B. G. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 472, n. 3-4, p. 373-398, 1977.

HUME, W. R. Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 9, p. 1013-1015, 1983.

INOUE, H.; UOBE, K.; HIRAI, M.; MASADA, Y.; HASHIMOTO, K. Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XXXI. Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of iridoid and secoiridoid glucosides. **J. Chromatogr.**, v. 118, n. 2, p. 201-216, 1976.

- ISIDOROV, V. A.; ZENKEVICH, I. G.; KRAJEWSKA, U.; DUBIS, E. N.; JAROSZYNSKA, J.; BAL, K. Gas chromatographic analysis of essential oils with preliminary partition of components. **Phytochem. Anal.**, v. 12, n. 2, p. 87-90, 2001.
- ISOM, L. L.; DE JONGH, K. S.; PATTON, D. E.; REBER, B. F.; OFFORD, J.; CHARBONNEAU, H.; WALSH, K.; GOLDIN, A. L.; CATTERALL, W. A. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. **Science**, v. 256, n. 5058, p. 839-842, 1992.
- JENG, J. H.; HAHN, L. J.; LU, F. J.; WANG, Y. J.; KUO, M. Y. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. 5, p. 1050-1055, 1994.
- JIANG, Y.; LEE, A.; CHEN, J.; CADENE, M.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. The open pore conformation of potassium channels. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 523-526, 2002.
- KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 423-427, 2007.
- KELLENBERGER, S.; WEST, J. W.; CATTERALL, W. A.; SCHEUER, T. Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 109, n. 5, p. 607-617, 1997.
- KHODOROV, B. I. Role of inactivation in local anesthetic action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 625, p. 224-248, 1991.
- KIM, S. S.; OH, O. J.; MIN, H. Y.; PARK, E. J.; KIM, Y.; PARK, H. J.; NAM, H. Y.; LEE, S. K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. **Life Sci.**, v. 73, n. 3, p. 337-348, 2003.
- LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L. F.; MAGALHAES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 43, n. 2, p. 250-257, 2004.
- LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SOUZA, I. T.; FIGUEIREDO, I. M. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 327, n. 1, p. 113-124, 1994.
- LEE, M. H.; YEON, K. Y.; PARK, C. K.; LI, H. Y.; FANG, Z.; KIM, M. S.; CHOI, S. Y.; LEE, S. J.; LEE, S.; PARK, K.; LEE, J. H.; KIM, J. S.; OH, S. B. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 9, p. 848-851, 2005.
- LI, H. L.; GALUE, A.; MEADOWS, L.; RAGSDALE, D. S. A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, n. 1, p. 134-141, 1999.
- LI, H. Y.; PARK, C. K.; JUNG, S. J.; CHOI, S. Y.; LEE, S. J.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Eugenol inhibits K⁺ currents in trigeminal ganglion neurons. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 9, p. 898-902, 2007.

LIU, Y.; JURMAN, M. E.; YELLEN, G. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 859-867, 1996.

MAGYAR, J.; SZENTANDRASSY, N.; BANYASZ, T.; FULOP, L.; VARRO, A.; NANASI, P. P. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 487, n. 1-3, p. 29-36, 2004.

MAURICE, C. G.; KROEGER, A. V.; KRIEGER, M. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROOT CANAL SEALING AGENTS. **J. Dent. Med.**, v. 20, p. 7-12, 1965.

MCCORMICK, K. A.; SRINIVASAN, J.; WHITE, K.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 46, p. 32638-32646, 1999.

MCPHEE, J. C.; RAGSDALE, D. S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 2, p. 1121-1129, 1998.

MITROVIC, N.; GEORGE, A. L., JR.; HORN, R. Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. **J. Gen. Physiol.**, v. 115, n. 6, p. 707-718, 2000.

MORGAN, K.; STEVENS, E. B.; SHAH, B.; COX, P. J.; DIXON, A. K.; LEE, K.; PINNOCK, R. D.; HUGHES, J.; RICHARDSON, P. J.; MIZUGUCHI, K.; JACKSON, A. P. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 5, p. 2308-2313, 2000.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Organic Chemistry**. Boston: Allyn and Bacon, Inc., 1961.

NAIDU, K. A. Eugenol - an inhibitor of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 53, n. 5, p. 381-383, 1995.

NISHIJIMA, H.; UCHIDA, R.; KAMEYAMA, K.; KAWAKAMI, N.; OHKUBO, T.; KITAMURA, K. Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 79, n. 3, p. 327-334, 1999.

NODA, M.; SHIMIZU, S.; TANABE, T.; TAKAI, T.; KAYANO, T.; IKEDA, T.; TAKAHASHI, H.; NAKAYAMA, H.; KANAOKA, Y.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H.; RAFTERY, M. A.; HIROSE, T.; INAYAMA, S.; HAYASHIDA, H.; MIYATA, T.; NUMA, S. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. **Nature**, v. 312, n. 5990, p. 121-127, 1984.

O'REILLY, J. P.; WANG, S. Y.; WANG, G. K. Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na(v)1.4 sodium channels. **Biophys. J.**, v. 81, n. 4, p. 2100-2111, 2001.

OGATA, N.; TATEBAYASHI, H. Ontogenic development of the TTX-sensitive and TTX-insensitive Na⁺ channels in neurons of the rat dorsal root ganglia. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 65, n. 1, p. 93-100, 1992.

OHKUBO, T.; KITAMURA, K. Eugenol activates Ca^{2+} -permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 11, p. 1737-1744, 1997.

OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 4, p. 848-851, 1997.

ONG, B. H.; TOMASELLI, G. F.; BALSER, J. R. A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence. **J. Gen. Physiol.**, v. 116, n. 5, p. 653-662, 2000.

OZEKI, M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. **Comp Biochem. Physiol C.**, v. 50, n. 2, p. 183-191, 1975.

PARK, C. K.; LI, H. Y.; YEON, K. Y.; JUNG, S. J.; CHOI, S. Y.; LEE, S. J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 10, p. 900-904, 2006.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBUCHER, A. Biotechnological production of vanillin. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 3-4, p. 296-314, 2001.

RAGSDALE, D. S.; AVOLI, M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 26, n. 1, p. 16-28, 1998.

RAGSDALE, D. S.; MCPHEE, J. C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Molecular determinants of state-dependent block of Na^+ channels by local anesthetics. **Science**, v. 265, n. 5179, p. 1724-1728, 1994.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

ROMPELBERG, C. J.; VERHAGEN, I. I.; VANBLADEREN, P. J. Effects of naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole drug metabolizing enzymes in rat liver. **Food Chem. Toxicol.**, v. 31, n. 9, p. 673-645, 1993.

ROY, M. L.; NARAHASHI, T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, v. 12, n. 6, p. 2104-2111, 1992.

SATO, C.; UENO, Y.; ASAI, K.; TAKAHASHI, K.; SATO, M.; ENGEL, A.; FUJIYOSHI, Y. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1047-1051, 2001.

SCHREIBMAYER, W.; WALLNER, M.; LOTAN, I. Mechanism of modulation of single sodium channels from skeletal muscle by the beta 1-subunit from rat brain. **Pflugers Arch.**, v. 426, n. 3-4, p. 360-362, 1994.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 367-377, 1976.

SENSCH, O.; VIERLING, W.; BRANDT, W.; REITER, M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 6, p. 1089-1096, 2000.

SHEETS, M. F.; HANCK, D. A. Charge immobilization of the voltage sensor in domain IV is independent of sodium current inactivation. **J. Physiol.**, v. 563, n. Pt 1, p. 83-93, 2005.

SHEETS, M. F.; HANCK, D. A. Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 121, n. 2, p. 163-175, 2003.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TSURUDA, K.; TAKAHASHI, H. Mode of analgesic action of phenolic dental medicaments through substance P release. **Jpn. J. Oral Biol.**, v. 36, p. 49-59, 1994.

SIEMONEIT, K. D.; ZIPF, H. F.; DITTMANN, E. C. Studies on endoanesthetic and hypnotic/narcotic effects of 2-methoxy-4-allyl-phenoxyacetic acid-N,N-diethylamide (G 29505) and related phenol derivatives. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 164, n. 1, p. 30-46, 1966.

SMITH, M. R.; GOLDIN, A. L. Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. **Biophys. J.**, v. 73, n. 4, p. 1885-1895, 1997.

STRUYK, A. F.; CANNON, S. C. Slow inactivation does not block the aqueous accessibility to the outer pore of voltage-gated Na channels. **J. Gen. Physiol.**, v. 120, n. 4, p. 509-516, 2002.

SZABADICS, J.; ERDELYI, L. Pre- and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. neurons. **Acta Biol. Hung.**, v. 51, n. 2-4, p. 265-273, 2000.

TAIRA, J.; IKEMOTO, T.; YONEYA, T.; HAGI, A.; MURAKAMI, A.; MAKINO, K. Essential oil phenyl propanoids. Useful as -OH scavengers? **Free Radic. Res. Commun.**, v. 16, n. 3, p. 197-204, 1992.

TAO, G.; IRIE, Y.; LI, D. J.; KEUNG, W. M. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, n. 15, p. 4777-4788, 2005.

VILIN, Y. Y.; FUJIMOTO, E.; RUBEN, P. C. A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na⁺ channel slow inactivation. **Biophys. J.**, v. 80, n. 5, p. 2221-2230, 2001.

VLACHOS, N.; SKOPELITIS, Y.; PSAROUDAKI, M.; KONSTANTINIDOU, V.; CHATZILAZAROU, A.; TEGOU, E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. **Anal. Chim. Acta**, v. 573-574, p. 459-465, 2006.

WANG, S. Y.; BONNER, K.; RUSSELL, C.; WANG, G. K. Tryptophan scanning of D1S6 and D4S6 C-termini in voltage-gated sodium channels. **Biophys. J.**, v. 85, n. 2, p. 911-920, 2003.

YANG, B. H.; PIAO, Z. G.; KIM, Y. B.; LEE, C. H.; LEE, J. K.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 10, p. 781-785, 2003.

YAROV-YAROVY, V.; MCPHEE, J. C.; IDSVOOG, D.; PATE, C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 38, p. 35393-35401, 2002.

YU, F. H.; WESTENBROEK, R. E.; SILOS-SANTIAGO, I.; MCCORMICK, K. A.; LAWSON, D.; GE, P.; FERRIERA, H.; LILLY, J.; DISTEFANO, P. S.; CATTERALL, W. A.; SCHEUER, T.; CURTIS, R. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 20, p. 7577-7585, 2003.

ZIMMER, T.; BENNDORF, K. The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. **J. Gen. Physiol.**, v. 120, n. 6, p. 887-895, 2002.