WILSON ALVES FERREIRA JÚNIOR

Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT₃ e canais iônicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

WILSON ALVES FERREIRA JÚNIOR

**Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico,
sobre receptores 5-HT₃ e canais iônicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira Júnior, Wilson Alves.

Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico,
sobre receptores 5-HT3 e canais iônicos / Wilson Alves Ferreira Júnior.
-- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia. Linha de pesquisa: Ação de toxinas animais no processo
de geração e controle da dor.

Versão do título para o inglês: Characterization of the effect of BDS
391, an analgesic compound, on 5-HT3 receptors and ion channels.

1. Anêmonas do Mar 2. Antinocicepção 3. Canais TRPV1 4.
Receptor 5-HT3 5. Bunodosina 391 (BDS 391) I. Cury, Profa. Dra.
Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB063/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wilson Alves Ferreira Júnior.

Título da Tese: Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT3 e canais iônicos.

Orientador(a): Profa. Dra. Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028** nas fls. **100** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Yara Cury**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT3 e canais iônicos*" do qual participam o(s) alunos **Wilson Alves Ferreira Júnior**, **Vanessa Pacciari Gutierrez** e a pesquisadora **Gisele Picolo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.03.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 25 de março de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP. 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do Efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT3 e canais iônicos" **protocolo n° 803/11** sob a responsabilidade de Yara Cury, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled "Characterization of the effect of BDS 391, an analgesic compound, on 5-HT3 receptors and ion channels", **protocol n° 803/11**, under the responsibility of Yara Cury, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto: 04/2011 – 04/2015	N° de animais/espécie
Laboratório Especial de Dor e Sinalização	304 ratos Wistar Machos

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

“O Temor do Senhor é o principip da sabedoria”

Pv. 9-10

Ode to the nematocyst

Wondrous little organelle of death;

O to know your mysteries.

A coiled harpoon of lightning speed,

Revealing species' histories.

Banana-shaped or ovoid,

Large or small, or spheres.

Measured in tens of microns,

Powerful microns of fear.

Forty thousand G's of force,

Drilling into flesh;

Bathed in a golden toxin,

Spiny hypodermic of death.

Designed to conquer prey or foe,

But if you longer linger,

Fascinating capsules of beauty,

These treasures of St. Inger.

.....St. Inger, the Patron Saint of Marine Envenomation

Dedicatória

Dedico este trabalho

A minha amada esposa Priscilla e ao nosso filho Daniel

Por estar presente e me apoiando em todos os momentos durante este está jornada. E agora também agradeço a DEUS por nos presentear com nosso filho muito amado Daniel.

Aos meus queridos pais, Wislon e Nitinha

Por permitirem que eu sempre pudesse seguir o MEU caminho. Agradeço especialmente pelo respeito ao meu trabalho. Amos vocês.

Aos meus irmãos Juliano e Juliane

Por estarem sempre presentes. E agora as minhas sobrinhas e sobrinho: Letícia, Natalya e Henrique, por trazerem mais alegria para nossa família. Vocês são muito importantes na minha vida.

A minha segunda Família: Reinaldo, Dolores, Laís e Samuel

Amo muito vocês...

Agradeço e dedico este trabalho,

A Yara

*Muito obrigado pela confiança e amizade construída nesses 9 anos de Butantan.
Agradeço também toda a paciência e a maneira admirável com que você consegue
passar, aos alunos, o amor e seriedade necessária para fazer ciência de qualidade.
Muito obrigado!*

Aos meus amigos

*O maior conquista desta trajetória foi descobrir, no dia a dia, novos **AMIGOS** e que estes estarão sempre ao meu lado, incentivando, aplaudindo e principalmente mostrando nossos erros. Adoro todos vocês.*

***Cesar**, muito obrigado pelos ensinamentos, conselhos e as merecidas “puxadas de orelha”. Você é um grande exemplo de dedicação e amor à arte de fazer ciência.*

***Vanzinha, Gisele, Nat, Luiza, Elis, Fran e Leandro**, obrigado por fazerem parte desta conquista, pelo ensinamento e os bons momentos vividos no LÉDS.*

***André**, obrigado por todo apoio. Sempre com tempo para discutir os resultados. Muito obrigado pela nossa amizade.*

***Aos técnicos e amigos do LÉDS... Juliana, Aninha, Sandra, Tânia, Claudemir e Priscila** vocês são fundamentais para o nosso laboratório. Muito obrigado!*

***Aos novos colegas do Laboratório de Eletrofisiologia: Daniel e Erika**. Muito obrigado por toda ajuda e ensinamentos.*

Agradecimentos

Ao Professor Dr. José Carlos de Freitas, do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos, IB-USP, por ser referência como Professor e Pesquisador, muito obrigado pelo Mestre que você é na minha formação.

Ao Prof. Dr. Katsuhiko Konno, da Faculdade de Medicina Tropical, Universidade de Toyama, Japão, por toda ajuda com a síntese do composto do BDS 391.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cassola, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pela co-orientação e oportunidade de realizar estagio em seu laboratório e aprender a obter registros eletrofisiológicos.

A Monica, Camila, Mirian e Celso do Departamento de Pós-Graduação do ICB, por estarem sempre dispostos a resolver qualquer problema.

Aos alunos do Laboratório Especial de Dor e Sinalização do Instituto Butantan.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Ao Biotério Central do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos animais.

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Ferreira Júnior, WA. Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT₃ e canais iônicos. 2015. Tese (Doutorado em Farmacologia) – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

As anêmonas do mar utilizam rico complexo proteico para capturar suas presas e se defender de predadores. A peçonha destes animais contém neurotoxinas (3–5 kDa), com ação em canais iônicos específicos, e hemolisinas (18–20 kDa), que atuam formando poros em membranas. No entanto, pouco se conhece sobre a atividade biológica de substâncias de baixo peso molecular isoladas da peçonha destes animais. Foi demonstrado, pelo nosso grupo, que a Bunodosina 391 (BDS 391), um composto de baixo peso molecular isolado da peçonha da anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*, induz potente efeito antinociceptivo periférico, em modelos experimentais de dor aguda e persistente. Ensaios farmacológicos mostraram que a atividade analgésica do BDS 391 é mediada pela ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT₃. O BDS 391 é um composto bromado formado por um núcleo molecular semelhante a serotonina (5-HT), conectado, por meio de uma ligação peptídica, a uma histidina. A semelhança estrutural com a 5-HT e o envolvimento de receptores 5-HT₃ no efeito antinociceptivo deste composto, torna de especial interesse a ampliação da caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na ação do BDS 391. Há evidências crescentes da co-expressão de receptores 5-HT e TRPV1 e a interação entre esses dois receptores na modulação da excitabilidade de neurônios sensitivos envolvidos na nocicepção. O receptor TRPV1 é considerado um receptor polimodal, uma vez que pode ser ativado por diversos estímulos. Baseado em estudos farmacológicos, mostrando que o BDS 391 apresenta potente efeito antinociceptivo em modelo de hipernocicepção mecânica, mediado pela ativação de receptores 5-HT₃ periféricos o presente projeto de pesquisa teve como objetivo ampliar a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na ação do BDS 391 investigando a interação deste composto com os receptores 5-HT₃, por meio de ensaios de ligação (“binding”). Uma vez que nossos resultados demonstraram que o composto BDS 391 não é capaz de interagir diretamente com os receptores 5-HT₃, sugerindo que o envolvimento destes receptores no efeito analgésico induzido pelo BDS 391 pode decorrer de uma ação indireta do BDS 391, avaliamos outros possíveis alvos farmacológicos para este composto. Por tanto investigamos, por meio de ensaios eletrofisiológicos e ensaios de imageamento de influxo de Ca²⁺ em cultura de neurônios do DRG de ratos, a possível ação do BDS 391 sobre correntes iônicas Ca²⁺ em canais para cálcio dependentes de voltagens (Cavs). Outro alvo avaliado foram os canais TRPV1. Foram realizados ensaios in vivo, utilizando modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina, e ensaios in vitro (imageamento do influxo de Ca²⁺). Nossos resultados evidenciaram que o BDS 391 não interage com os Cavs, porém bloqueia o influxo de Ca²⁺ induzido pela capsaicina, além de inibir a hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina. Em conjunto, estes dados sugerem que os canais TRPV1 são alvos importantes da ação do BDS 391.

Palavras-chave: BDS 391. Anêmonas do mar. Antinocicepção. Canais TRPV1. Receptores 5-HT₃.

ABSTRACT

Ferreira Júnior, WA. Characterization of the effect of BDS 391, an analgesic compound, on 5-HT₃ receptors and ion channels. [Ph.D. (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Sea anemones employ a wide range of bioactive compounds to capture their prey or fend off possible predators. Sea anemone venom contains neurotoxins (3-5 kDa), with action on ion channels, and also hemolysin (18-20 kDa), which acts by forming pores in membranes. However, little is known about the biological activity of low molecular weight substances isolated from the venom of these animals. One of these substances is Bunodosine 391 (BDS 391), a low molecular weight (391 Da) and non-peptidic compound purified from the venom of the Brazilian *Bunodosoma cangicum* sea anemone. We have demonstrated that BDS 391, administered by intraplantar (i.pl.) route into a rat hind paw, induces potent peripheral antinociceptive effect in models of acute and chronic pain. Pharmacological studies have shown that the antinociceptive effect of the BDS 391 is mediated by activation of 5-HT₃ receptors. Studies on the structure of BDS 391 have demonstrated that this compound is made up of a bromoindole group connected to histidine. Data from the literature have shown that the peripheral release of 5-HT interferes with thermal hyperalgesia, via modulation of TRPV1 receptors. The aim of the present work is to further characterize the mechanisms involved in the antinociceptive effect of BDS 391 (a) evaluating the ability of this substance to directly activate 5-HT₃ receptors, (b) characterizing the effect of BDS 391 on capsaicin-evoked thermal hyperalgesia and (c) investigating the involvement of TRPV1 ion channels in this effect. Pharmacological studies have shown that BDS 391 induces antinociception in the capsaicin-evoked thermal hyperalgesia. Ondansetron (5-HT₃ receptor antagonist) inhibits the effect of BDS 391, indicating the involvement of 5-HT₃ in the antinociceptive effect of this substance. However, binding studies have shown that BDS 391 does not directly interact with the 5-HT₃ receptor. The possible effect of BDS 391 on TRPV1 ion channels was investigated in vitro, through Ca²⁺ imaging studies. Cultured DRG neurons were used for Ca²⁺ imaging. BDS 391 inhibited capsaicin-evoked Ca²⁺ influx in DRG neurons, indicating a modulatory action on the activity of TRPV1. Our results suggest that the antinociceptive effect of BDS 391 could involve the inhibition of TRPV1 channels and, indirectly, the modulation of 5-HT₃ receptors.

Keyword: BDS 391. Sea anemone. Pain. TRPV1 channels. 5-HT₃ receptors

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-BrIAA-His	6-Bromo-indolacético-histidina
6-BrIAA-OH	6-Bromo-hidroxi-indolacético
AMPc	3', 5' - adenosina – monofosfato cíclico
ASIC	Canais iônico para potássio sensível a pH
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BDS 391	Bunodosina 391
CCI	Constricção crônica do nervo isquiático
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação animal do ICB-USP
CEUAIB	Comissão de Ética o uso de animais do Instituto Butantan
CH₃CN	Acetonitrila
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
DMF	Dimetilformamida
DRG	Ganglio da raiz dorsal
ERKs	Quinases reguladas por sinais extracelulares
GABA	Ácido gama aminobutírico

GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
hERG	Canais iônicos cardíaco humano para potássio
i. pl.	Administracao intraplantar
Kd	Constante de dissociação
Ki	Constante de ionização
Kv	Canais para potássio dependentes de voltagem
MeOH	Metanol
Nav	Canais para sódio dependentes de voltagem
NMDA	Receptor glutamatergico (N-metil-D-aspartato)
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteinoquinase A
PKC	Proteinoquinase C
PKG	Proteinoquinase G
RNAm	Acido ribonucléico mensageiro
s. c.	Administracao subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TFA	Acido trifloracetico
TRPV1	Canais catiônicos ativado por ligantes (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
<i>1.1 Toxinas de anêmonas do mar.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2 Bunodosina 391 (BDS 391).....</i>	<i>20</i>
<i>1.3 Envolvimento da serotonina na geração e modulação da dor – papel do receptor 5HT₃.....</i>	<i>23</i>
<i>1.4 Receptor de Potencial Transitório (TRP).....</i>	<i>26</i>
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
<i>3.1 Síntese do composto BDS 391.....</i>	<i>31</i>
<i>3.2 Determinação dos espectros de massa.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3 Animais.....</i>	<i>32</i>
<i>3.4 Indução de hiperalgesia mecânica por prostaglandina E₂ em rato.....</i>	<i>33</i>
<i>3.5 Indução de hiperlagesia térmica por Capsaicina.....</i>	<i>34</i>
<i>3.6 Tratamentos Farmacológicos.....</i>	<i>34</i>
<i>3.7 Ensaio de ligação (“Binding”) em receptores serotoninérgicos 5-HT₃.....</i>	<i>35</i>
<i>3.8 Cultura de células para estudos eletrofisiológicos.....</i>	<i>37</i>
<i>3.9 Avaliação da concentração de Cálcio intracelular ([Ca²⁺]_i) por imagem de fluorescência.....</i>	<i>38</i>
<i>3.10 Registros Eletrofisiológicos.....</i>	<i>39</i>
<i>3.11 Análises Estatística.....</i>	<i>42</i>
4 RESULTADOS.....	44
<i>4.1 Síntese do BDS 391.....</i>	<i>44</i>
<i>4.2 Efeito antinociceptivo do BDS 391 sintético.....</i>	<i>46</i>
<i>4.3 Ensaio de ligação (“Binding”) do BDS 391 a receptores 5-HT₃.....</i>	<i>47</i>
<i>4.4 Efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina.....</i>	<i>48</i>
<i>4.5 Envolvimento dos receptores 5-HT₃ no efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina.....</i>	<i>49</i>

<i>4.6 Efeito do BDS 391 sobre o influxo de íons Cálcio induzido pela tratamento com KCl em culturas de neurônios do DRG.....</i>	<i>50</i>
<i>4.7 Ação do BDS 391 sobre correntes de íons Cálcio em neurônios do DRG de ratos.....</i>	<i>51</i>
<i>4.8 Efeito do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina.....</i>	<i>54</i>
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	69
REFERENCIAS.....	70
ANEXO.....	81
<i>A - Efeito do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina.....</i>	<i>81</i>
<i>B - Ensaio de ligação (“FLIRP”) do BDS 391 a canais TRPV1.....</i>	<i>83</i>
<i>C – Efeito do BDS 391 sobre a liberação de CGRP induzida pelo calor em pele de rato sensibilizada pela bradicinina.....</i>	<i>84</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Toxinas de anêmonas do mar

O Filo Cnidário representa um grupo animal exclusivamente marinho, porém altamente diversificado, com mais de 7600 espécies. De acordo com as características morfológicas, os Cnidários foram divididos em 4 classes: Anthozoa, Hidrozoa, Cubozoa e Scyphozoa. As anêmonas do mar, assim como os corais, pertencem à classe Anthozoa.

Uma característica comum a todos esses animais é a presença de cnidocistos ou nematocistos. Estas estruturas celulares microscópicas, similares a arpões, são elaboradas no Aparelho de Golgi e posteriormente armazenadas em células especializadas denominadas Cnidócitos (1). Dentro das células, os cnidocistos ficam protegidos por um envoltório de colágeno.

Os Cnidócitos possuem uma estrutura superficial sensorial, o Cnidocil, responsável pela percepção e resposta a diferentes estímulos. Após a ativação, os nematocistos são ejetados para o meio extracelular, inoculando a peçonha, que é constituída por grande quantidade de substâncias bioativas (2). Os animais desse grupo empregam suas toxinas tanto para capturar presas quanto para a defesa contra predadores. Embora exista cerca de 30 tipos morfolologicamente distintos de cnidocistos, a maioria dos animais apresenta baixa diversidade destas estruturas (1).

A grande maioria das espécies descritas de Cnidários é considerada inofensiva quando em contato com a pele humana e menos de 1% das espécies tem sido implicada em acidentes com humanos. No entanto, muitas toxinas vêm sendo isoladas da peçonha destes animais e caracterizadas tanto bioquímica quanto farmacologicamente. Estes estudos tem evidenciado a presença de neurotoxinas que agem, por exemplo, em canais de sódio e potássio dependentes de voltagem (3-5), além de hemolisinas, as quais são proteínas que formam poros em membranas celulares e causam desequilíbrio osmótico e lise celular (6, 7)

Em relação às neurotoxinas, estudos experimentais tem evidenciado que as toxinas isoladas de anêmonas do mar apresentam ações em diversos tipos de canais iônicos, mostrando grande potencial farmacológico. Assim, foi observado que a toxina ShK, isolada da anêmona caribenha *Stichodactyla helianthus*, apresenta potente atividade bloqueadora de canais para K^+ dependentes de voltagem, discriminando principalmente os subtipos Kv1.1 e 1.3 (8) e Kv3.2 (9). Os canais Kv1.3 são expressos em linfócitos-T, durante ativação do sistema imune. Desta forma, a caracterização de fármacos capazes de bloquear estes canais torna-se altamente atrativa para terapias de controle de doenças autoimunes (10-12). Neste sentido, foram obtidos, por meio de mutações sítio-dirigidas, análogos da toxina ShK, com maior atividade biológica, para possibilitar o desenvolvimento de imunossupressores (13). Foram também estabelecidas metodologias teóricas para a síntese de compostos que apresentem apenas as cadeias laterais dos aminoácidos envolvidos no bloqueio destes canais (14). Em 2008, Andreev e colaboradores (15) observaram que o composto APHC1, um polipeptídeo de 56 resíduos de aminoácidos obtido da anêmona *Heteractis crispa*, era capaz de interagir com receptores TRPV1, bloqueando parcialmente as correntes iônicas induzidas por capsaicina. Baseado nessas atividades, foi mostrado que esse peptídeo é acarreta, in vivo, efeito antinociceptivo.

Das anêmonas encontradas no Brasil, a espécie *Bunodosoma caissarum*, espécie endêmica da costa brasileira, é uma das mais estudadas. Em 1993, foi isolada da fração neurotóxica da peçonha desta anêmona, um polipeptídeo de 48 resíduos de aminoácidos, denominado BcIII, que pertence às toxinas do tipo 1 de anêmonas do mar (16). As toxinas do tipo 1 apresentam posição conservada dos seis resíduos de cisteína, que são importantes na determinação estrutural, discriminando canais de Na^+ (17). Estas toxinas se ligam ao sítio 3 destes canais de Na^+ . Esta toxina foi ensaiada em canais de sódio dos tipos Nav 1.1 a 1.6, os quais estão presentes no sistema nervoso central (Nav1.1, 1.2, 1.3), sistema nervoso periférico (Nav1.6), musculatura esquelética (Nav1.4) e cardíaca (Nav1.5). Os resultados mostraram que a BcIII, da mesma forma que toxinas isoladas das anêmonas *Anemonia sulcata* (ATXII) e *Anthopleura fuscoviridis* (AFTII), liga-se a alguma outra região dos canais de sódio, além do sítio 3 (5). Como consequência, há retardo na inativação desses canais e aumento do pico da corrente e da corrente persistente. Esses dados sugerem que outras regiões dos canais de sódio, além do sítio 3, estão envolvidas no processo de inativação destes canais e favorecem a utilização destes

peptídeos de anêmonas como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas ou como importantes ferramentas farmacológicas no estudo da biofísica de canais de sódio. É importante ressaltar ainda, que em 2006, uma nova toxina foi isolada da peçonha da *Bunodosoma caissarum*. Este peptídeo, denominado BcIV, atua especificamente em correntes de Na^+ de crustáceos (4).

Outra anêmona da costa brasileira que vem sendo estudada é a *Bunodosoma cangicum*, congênere de *B. caissarum*. Araque e colaboradores (18) avaliaram a peçonha deste animal e encontraram atividade inibitória sobre canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} . Posteriormente, Lagos e colaboradores (19) observaram que diferentes frações da peçonha desta anêmona apresentam atividade hemolítica e neurotóxica. Estas neurotoxinas atuam sobre canais de sódio dependentes de voltagem, além de inibirem canais de potássio dependentes de voltagem. Em 2005, foi isolado e caracterizado, da *B. cangicum*, um novo peptídeo contendo 48 resíduos de aminoácidos, claramente pertencente às toxinas do tipo 1, denominado Cangitoxina (CGTX) (20). Posteriormente, Zaharenko e colaboradores (21) demonstraram a presença de duas isoformas desta toxina, CGTXII e CGTXIII, que são eluídas juntamente com a Cangitoxina.

Além das neurotoxinas e das hemolisinas, a peçonha das anêmonas contem compostos de baixo peso molecular (300 a 1000 Da) Garateix e colaboradores (22) observaram que uma fração, denominada fração D, eluída no final da cromatografia de gel-filtração da peçonha da anêmona *Phyllactis flosculifera*, coletada no litoral de Cuba, bloqueava receptores glutamatérgicos metabotrópicos em neurônios de gastrópodes. Sabe-se, por exemplo, que o neurotransmissor muscular de crustáceos, os quais servem de alimentação para as anêmonas do mar, é o glutamato. Desta forma, é possível que predadores desses invertebrados tenham desenvolvido, além de toxinas que atuam em canais iônicos, toxinas que possam interferir com receptores glutamatérgicos e assim ampliar seu arsenal químico para facilitar a captura de alimentos. Mais recentemente, Domingues-Perez e colaboradores (2013)(23) mostraram que uma fração de baixo peso molecular (fração ZsG50-III), obtida a partir do extrato bruto do *Zoanthus sociatus*, um Cnidário da mesma classe das anêmonas do mar (classe Anthozoa), diminui a atividade exploratória de camundongos, além de causar distúrbios respiratórios e em altas doses, espasmos, palpitações e convulsões.

1.2 *Bunodosina 391 (BDS 391)*

Em 2011 foram isolados compostos bromados e de baixo peso molecular (300 e 600 Da) da peçonha da anêmona do mar *B. cangicum*. A estrutura dessas moléculas é composta de um núcleo estrutural semelhante à serotonina e conectada, por meio de uma ligação peptídica, a um aminoácido. Estudos de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (NMR) mostraram que no composto majoritário da fração V, denominado Bunodosina 391 (BDS 391), a ligação peptídica ocorre entre o núcleo molecular serotonina-símile e uma histidina (Figura 2 e Figura 1) (24). Não se conhece ainda, se o BDS 391 está presente na peçonha destes animais, como resultado de degradação metabólica de aminoácidos ou se esta molécula tem papel efetivamente importante para a captura de presas, defesa ou disputas intraespecíficas e interespecíficas por território. Dados de literatura têm mostrado que moléculas de 5-HT, histamina e outras bioaminas estão presentes na peçonha de certas espécies de escorpiões e vespas (25, 26) e que estas bioaminas estão envolvidas no processo de geração da dor em acidentes de humanos com estes animais peçonhentos; contudo, esta é a primeira vez que se demonstra a presença de moléculas com estrutura similar à serotonina, na peçonha de anêmonas do mar.

Por apresentar, estruturalmente, um núcleo molecular similar a serotonina, ligado a uma histidina, a possível ação do BDS 391 nas vias de transmissão da dor foi investigada pelo nosso grupo(24). Interessantemente, ensaios comportamentais evidenciaram que o BDS 391 (0,006 - 6 µg/pata), administrado perifericamente em ratos e camundongos, apresenta potente efeito antinociceptivo, em modelos de dor aguda e crônica. No teste da formalina, o BDS 391 reverteu parcialmente a 1ª fase (fase neurogênica) e bloqueou a 2ª fase (fase inflamatória) da nocicepção. No modelo de dor neuropática acarretada pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos, o composto inibiu a hiperalgesia e reverteu parcialmente o quadro de alodinia (Ferreira Junior, WA e Cury, Y - manuscrito em fase de elaboração).

Em decorrência da similaridade estrutural com a 5-HT e de dados da literatura relatando a presença destes receptores em tecidos periféricos (27-29), foi investigado o envolvimento de receptores para serotonina no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391, utilizando

antagonistas seletivos para os receptores 5-HT_{1a}, 5-HT₂ e 5-HT₃. Os estudos mostraram que este efeito antinociceptivo é mediado pela ativação de receptores 5HT₃ periféricos (Ferreira Júnior, WA e Cury, Y - manuscrito em fase de elaboração). É importante ressaltar que o subtipo 5-HT₃ é um receptor de canal iônico não específico, diferente dos demais subtipos de receptores 5-HT, que são acoplados à proteína G (30). Apesar desses dados e do fato da molécula BDS 391 ter uma estrutura similar a serotonina, não é possível ainda afirmar que este composto é capaz de atuar diretamente sobre os receptores 5-HT₃.

Os resultados mostrando o envolvimento de receptores serotoninérgicos no efeito antinociceptivo do BDS 391 são interessantes, uma vez que dados de literatura, apesar de controversos, tem mostrado, pelo menos para os receptores serotoninérgicos presentes nos tecidos periféricos, que a ativação destes receptores é um importante mecanismo envolvido na gênese de fenômenos nociceptivos (31-34). Contudo, efeitos controversos destas aminas, na modulação da dor, têm sido relatados (35-37). Estudos anteriores, realizado pelo nosso grupo, mostraram que a administração do agonista seletivo para o receptor 5-HT₃ (Biguanide) administrado via intraplantar (i.pl.) é capaz de inibir parcialmente a nocicepção induzida pela formalina, interferindo tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória. Cabe ressaltar que no o modelo de nocicepção induzida pela formalina (1%) é observado duas fases distintas de nocicepção, sendo a primeira fase uma resposta direta da ação do irritante sobre receptores (fase neurogênica) que é observada a partir do momento que a droga é administrada até 5 min e há uma segunda fase, relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (fase inflamatória) que é observada entre os tempos de 20 à 50 min após a administração da formalina (38).

Figura 1: (A) Perfil cromatográfico de cerca de 200 mg de proteína presente na peçonha de *B. cangicum* aplicados à coluna de gel de Sephadex G-50 (1,3 cm X 131 cm). Foram obtidas 5 frações (I, II, III, IV e V) Com base na literatura, as frações II e III possivelmente correspondem as frações hemolíticas e neurotóxicas, respectivamente. A barra horizontal representa o “pool” de fração que foi liofilizado e submetido a cromatografia de HPLC de fase reversa. (B) Cromatograma representativo de uma recromatografia da fração V (Fr V). Os números acima dos picos são denominações arbitrárias de cada um deles, de acordo com a ordem de eluição no cromatograma. A linha continua (% B) representa a variação do gradiente empregada. Empregou-se um gradiente linear de 5 a 55% de solvente B (CH_3CN / 0,1%TFA) a um fluxo de 2,5 mL/min durante 45min. O composto majoritário da FrV, denominado como pico 6, é a molécula alvo do nosso estudo (BDS 391).

Figura 2: Análise estrutural de BDS 391 por Ressonância Nuclear Magnética

1.3 Envolvimento da serotonina na geração e modulação da dor – papel do receptor 5HT₃

A Serotonina (5-HT) está envolvida nos processos de dor e seu controle, tanto no sistema nervoso periférico, quanto no sistema nervoso central (SNC) (39). Vários dados experimentais têm mostrado que a 5-HT, no SNC, induz efeito analgésico, por estimulação das vias descendentes inibitórias da dor (40, 41). A transmissão nociceptiva na medula espinhal é modulada por tratos descendentes excitatórios e inibitórios, os quais podem atuar em fibras aferentes primárias, ou ter ações em fibras pós-sinápticas ou em interneurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal (42). Tem sido demonstrado que o aumento na concentração de 5-HT no corno dorsal da medula espinhal, ativa os interneurônios inibitórios presentes neste sítio medular, resultando na inibição da transmissão da informação nociceptiva (43). Diversos subtipos de receptores serotoninérgicos, como 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃, medeiam o efeito analgésico da serotonina no SNC (32, 33).

Nos tecidos periféricos, diferentemente da ação no SNC, a serotonina é considerada um mediador inflamatório e pró-nociceptivo (44). A principal fonte celular de 5-HT, nos tecidos periféricos, são as plaquetas e os mastócitos. A concentração desta amina aumenta rapidamente quando ocorre inflamação ou lesão tecidual periférica (37). A ação da serotonina, liberada após injúria tecidual, é mediada pela ação em diferentes subtipos de receptores presentes nos

neurônios aferentes primários. O RNAm para os subtipos de receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A-C}, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ tem sido detectado em gânglios da raiz dorsal, sugerindo a presença destes receptores nos neurônios sensitivos primários, incluindo as fibras C (28, 44, 45). Estes estudos têm sugerido que a 5-HT pode atuar diretamente sobre as fibras C, porém o papel funcional da ativação dos diferentes tipos de receptores 5-HT por esta amina, não está ainda totalmente elucidado.

A serotonina, liberada durante injúria periférica, é tanto um ativador direto da transdução de sinal, no neurônio, como um sensibilizador para outros agentes transdutores. Assim, a ativação do receptor 5-HT₃, localizado nas terminações nervosas, favorece a abertura de canais iônicos e a passagem de correntes de Na⁺ e Ca²⁺, resultando na despolarização da fibra nervosa e na geração de potenciais de ação (46). Como mencionado anteriormente, o receptor 5-HT₃ é um receptor de canal catiônico pertencente à família de receptores GABA, em contraste com os demais subtipos de receptores 5-HT, os quais são receptores acoplados à proteína G (30).

O canal 5-HT₃, assim como os receptores nicotínicos (AChRs), os receptores para glicina (GlyR) e os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA_AR), são constituídos por cinco monômeros formando um poro permeável e seletivo a pequenos cátions (30, 47, 48). Estudos realizados principalmente nestas duas últimas décadas, com o intuito de ampliar a caracterização molecular e funcional destes receptores, demonstraram que os receptores 5-HT₃ têm cinco subunidades diferentes (5-HT₃ A-E). Estas subunidades apresentam diferenças nas regiões transmembranas e amino-terminal (49). Estudos têm sido realizados com o intuito de compreender o papel fisiológico das diferentes conformações dos receptores 5-HT₃ (47, 48, 50). Estes estudos têm mostrado que apenas o subtipo homomérico 5-HT_{3A} é fisiologicamente funcional. Por outro lado, trabalhos têm evidenciado que canais heteroméricos 5-HT_{3A/B} apresentam importante papel fisiológico, uma vez que as diferentes conformações interferem com a seletividade a ions Ca²⁺ pelo canal (51).

O receptor 5-HT₃ está presente no sistema nervoso central e periférico, em linfócitos, monócitos, no tecido gastro-intestinal e também em tecidos fetais (30, 52).

No sistema nervoso central, os receptores 5-HT₃ estão amplamente distribuídos, em diversas localizações como area postrema, nucleo do trato solitário, nucleo dorsal, nervo vago, nucleo caudato, amígdala, hipocampo, cortex frontal e singular (53, 54). No SNC, estes

receptores estão envolvidos na integração do reflexo de emesis, no controle e/ou facilitação da dor, no sistema de recompensa e controle da ansiedade. É importante salientar que estes receptores são geralmente, co-expressos em neurônios gabaérgicos. O efeito antinociceptivo induzido pela ativação de receptores 5-HT₃ está relacionado à liberação de GABA e consequente ativação da via descendente inibitória da dor (30). Por outro lado, resultados contraditórios foram obtidos em um estudo utilizando o mCPBG, um agonista de receptor 5-HT₃. Neste estudo foi observado que esse agonista, induz aumento da responsividade de neurônios da raiz dorsal da medula espinhal de ratos a estímulos nocivos, indicando o envolvimento destes receptores na nocicepção (55).

Os receptores 5-HT₃ presentes nas terminações nervosas tem importante papel no controle da liberação de neurotransmissores como dopamina, colecistocinina, glutamato, acetilcolina, GABA, substância P e também da liberação da própria serotonina na fenda sináptica (56, 57).

Os primeiros trabalhos evidenciando a presença de receptores 5-HT₃ nas fibras nervosas aferentes (58) favoreceram o desenvolvimento de estudos objetivando caracterizar o papel fisiológico destes receptores nestes neurônios. Estes estudos têm sugerido a participação do receptor 5-HT₃ em diferentes processos, incluindo as vias de transmissão da dor e seu controle.

Nas fibras nervosas aferentes, a ativação pré-sináptica do receptor 5-HT₃ induz aumento da resposta à dor, enquanto a inibição destes receptores por antagonistas seletivos é capaz de prevenir o desenvolvimento de dor crônica (59, 60). O papel pró-nociceptivo dos receptores 5-HT₃, presentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, deve resultar, pelo menos em parte, da liberação de neurotransmissores. Foi observado também, que a ativação dos receptores 5-HT₃ pós-sinápticos, acarreta influxo de íons Na⁺, resultando em rápida despolarização neuronal (46), contribuindo para a nocicepção.

Cabe ressaltar que o efeito acarretado pelos antagonistas de receptores 5-HT₃ não apresenta relação dose-resposta linear. Ainda estes antagonistas podem agir, com menor afinidade, em outros subtipos de receptores serotoninérgicos. Em conjunto, estas características dos antagonistas de receptores 5-HT₃ dificultam a caracterização dos possíveis efeitos pró- ou antinociceptivos decorrentes da ativação destes receptores. É importante mencionar que ambos os efeitos pró- e antinociceptivo já foram detectados para antagonistas seletivos deste receptor (55, 61, 62). Ainda, dados de literatura tem mostrado que o efeito da ativação de 5-HT₃ nas vias de sinalização da dor está condicionado à localização destes receptores (30).

Há evidências crescentes de que a ação hiperalgésica do 5-HT esteja relacionada com funções do receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) (63, 64). Estudos tem relatado a co-expressão de receptores 5-HT e TRPV1 em neurônios do gânglio trigeminal (TG), bem como a capacidade da serotonina em aumentar o acúmulo de Ca^{2+} em neurônios sensíveis a capsaicina no TG de ratos. Estudos têm mostrado ainda que a serotonina aumenta a excitabilidade da membrana do neurônio sensorial, a estímulos térmicos e a corrente de cálcio produzida por capsaicina e calor (63, 64). Tem sido observado também que a dor cardíaca crônica resultante de isquemia está relacionada a ativação de receptores TRPV1 e consequente liberação de substância P. A utilização de antagonistas de receptores 5-HT₃ é capaz de inibir a liberação da substância P, inibindo a dor (30).

A serotonina aumenta a liberação, induzida pela capsaicina, do peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), contudo, a serotonina não é capaz de interferir por si na liberação deste peptídeo. O aumento da atividade nociceptiva é atenuado por antagonistas seletivos de 5-HT periféricos (64). Por outro lado, a depleção de 5-HT atenua a dor visceral por redução na ativação de TRPV1.

Os receptores TRPV1 e 5-HT₃ estão envolvidos nos processos iniciais de transdução da informação nociceptiva e recebem atualmente, grande atenção da comunidade científica, pela sua importância para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela gênese da dor e seu controle.

1.4 Receptor de Potencial Transitório (TRP)

A superfamília de receptores de potencial transitório (TRP) é considerada o maior grupo de canais iônicos responsáveis pelo processo de transdução (65). Esta superfamília de receptores diferencia-se de outros grupos de canais iônicos, pela seletividade a íons, modo de ativação e funções fisiológicas.

Com base na sequência de aminoácidos, os membros da família TRP são classificados em seis subfamílias distintas - TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Polistina), TRPML (Mucopolina) e TRPA (Anquirina). Os membros da superfamília TRP apresentam seis domínios transmembrânicos com pequenas variações nas sequências de

aminoácidos e permeabilidade a cátions. Além disso, as regiões N- e C-terminal são voltadas para o meio intracelular e os domínios transmembrânicos formam um poro entre o domínio 5 e 6, por onde ocorre o influxo intracelular de íons (66-68).

Embora os canais TRP apresentem tais similaridades, são altamente diferenciados entre si, podendo ser ativados por estímulos distintos, como por exemplo, temperatura (calor ou frio), compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luminosidade, estresse oxidativo, ácidos e feromônios.

A família TRP possui ampla distribuição tecidual e a maioria das células do organismo expressa ao menos um membro desta família (68, 69). Vários TRPs têm sido detectados nos gânglios da raiz dorsal. Esses canais parecem estar envolvidos na transdução sensorial e podem participar da geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, mecânicos e térmicos (70, 71).

Devido à caracterização de sua contribuição para a transdução de estímulos sensoriais e não sensoriais, a subfamília TRPV (1 a 6) tem recebido crescente atenção. Os membros deste grupo são ativados por diversos estímulos, nocivos ou não, incluindo pimentas e outros derivados vegetais, mediadores inflamatórios, calor, prótons, estímulos osmo-sensoriais e mecano-sensoriais (72). O envolvimento dos receptores TRPV1 na nocicepção tem sido amplamente investigado.

O receptor TRPV1 foi confirmado como um canal iônico não seletivo, depois de ser clonado em ratos (73) e em humanos (72, 74, 75). Em mamíferos, o TRPV1 funciona como um receptor primário para estímulos nocivos, apesar de poder exercer outras funções.

O TRPV1 é significativamente expresso em neurônios sensoriais, sendo encontrado em fibras nociceptivas periféricas e centrais (corno dorsal da medula espinhal e no gânglio trigeminal) (76-79), apresentando expressão moderada em fibras nervosas de outros tecidos. Um aspecto importante do funcionamento dos canais TRPV1 é a sua sensibilização por um ou mais estímulos e/ou por compostos endógenos. A exposição de células que expressam TRPV1 a um meio ácido sensibiliza o receptor à ativação por calor, reduzindo seu limiar de ativação. Do mesmo modo, prótons sensibilizam o receptor aos efeitos da capsaicina (80). A sensibilização dos TRPV1 aumenta a probabilidade do canal ir para o estado aberto e assim permitir a entrada de íons, principalmente íons Ca^{2+} , para dentro da célula. (81, 82).

O TRPV1, em condições fisiológicas, dificilmente é ativado por pH baixo ou calor, o que sugere regulação preferencial por ligantes endógenos, os chamados endovanilóides. Este grupo compreende a anandamida, a N-araquidonil-dopamina e produtos da lipoxigenase (80). O receptor TRPV1 é considerado um receptor polimodal, uma vez que pode ser ativado por diversos estímulos como agonistas de lipídios endógenos, metabólitos do ácido araquidônico, pelo calor e meio extracelular, bem como pela capsaicina. Além disso, a ativação do TRPV1 pode ser potencializada por mediadores, tais como bradicinina, ATP, entre outros (83). Esta habilidade de integrar vários estímulos faz com que o TRPV1 seja um importante receptor para a modulação da dor e um alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos. Esta expectativa é baseada em estudos que demonstram que há aumento da expressão do TRPV1 em tecidos obtidos de pacientes afetados por condições como doenças inflamatórias, carcinomas e situações que envolvam a presença de fenômenos como hiperalgesia (aumento da sensibilidade a dor) (80).

Em relação os estudos experimentais visando avaliar o papel destes receptores nos processos nociceptivos, diversos agentes exógenos têm sido utilizados para estimulação destes receptores. Dentre estes agentes, destaca-se a capsaicina. A capsaicina é um alcaloide obtido da pimenta, um fruto de plantas do gênero *Capsicum*, nativas da América (84). A capsaicina é considerada um irritante natural, assim como o olvanil, o eugenol e a resiniferatoxina (denominados vanilóides), capaz de excitar terminações periféricas de neurônios sensoriais nociceptivos, por meio da ativação de receptores TRPV1 expressos nas fibras C e, em menor quantidade, nas fibras Aδ. A ativação desses receptores gera despolarização e consequente transdução de sinais que podem causar sensação de calor, ardor ou prurido (73, 85). A despolarização de nociceptores polimodais C em mamíferos, por influxo de cálcio nos receptores vanilóides, causa a liberação neuronal de substância P e outros neuropeptídeos, como o CGRP, a somatostatina e o peptídeo intestinal vasoativo (86), neurotransmissores importantes para a nocicepção.

Estes dados em conjunto apontam para a importância dos receptores TRPV1 para a dor, tornando o alvo importante para o desenvolvimento de novas drogas e terapias analgésicas, particularmente na vigência de dores neuropáticas e inflamatórias.

o
o   o

Como mencionado, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo evidenciaram a participação de receptores 5-HT₃, presentes nos tecidos periféricos, no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391. Estes dados são interessantes, uma vez que, de acordo com dados de literatura, o envolvimento destes receptores na nocicepção e seu controle é ainda bastante controverso (37, 87). Apesar destes dados, não foram ainda detectadas evidências sobre a interação direta do BDS 391 com receptores 5-HT₃. Ainda, baseado em dados de literatura evidenciando a co-expressão de receptores 5-HT e TRPV1 em neurônios sensitivos e que a serotonina modula os níveis de Ca²⁺ intracelular em neurônios sensíveis a capsaicina, torna-se relevante avaliar o efeito do BDS 391 sobre receptores TRPV1.

2 OBJETIVO

Baseado em estudos farmacológicos, mostrando que o composto BDS 391, obtido a partir da peçonha da anêmona do mar brasileira *Bunodosoma cangicum*, apresenta potente efeito antinociceptivo mediado pela ativação de receptores 5-HT₃ periféricos, o objetivo deste projeto é ampliar a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na ação do BDS 391, investigando a interação deste composto com receptores 5-HT₃ e também o possível efeito sobre receptores TRPV1.

Objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar o tipo de interação do BDS391 com receptores 5-HT₃ e o possível sítio de ligação por meio de estudos de ligação (“Binding”).
- ✓ Investigar a ação deste composto sobre correntes iônicas em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), por meio da técnica de “patch clamp”.
- ✓ Caracterizar a ação do BDS 391 sobre os canais TRPV1, por meio de ensaios eletrofisiológicos e de ensaios in vivo (atividade antinociceptiva em modelo de hiperalgesia térmica induzida por capsaicina).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese do composto BDS 391

Para a continuidade dos estudos de caracterização dos mecanismos na ação do BDS 391, foi necessária a utilização de maior quantidade de material do que aquela obtido pelos métodos de extração a partir da peçonha. Assim, utilizamos em nossos estudos, o composto BDS 391 sintético. A síntese do BDS 391 foi realizada pelo Prof. Dr. Katsuhiko Konno, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de Toyama, Toyama, Japão.

O composto BDS 391 sintético (6-BrIAA-His) foi obtido como descrito por Zaharenko e colaboradores, 2011 (24), utilizando sintetizador de peptídeos automatizado MAPS-8 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), pelo método de fase sólida.

Inicialmente a aminoacil resina His(Trt)-2-ClTrt foi suspendida em dimetilformamida (DMF), posteriormente foi adicionado uma nova solução em DMF contendo ácido 6-bromo-indolacético, TBTU [tetrafluorato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio] e HOBt (N- hidroxibenzotriazol). A mistura permaneceu em agitação, por 1 h, em temperatura ambiente. A resina filtrada obtida na fase anterior, foi lavada com metanol (MeOH) e o composto foi clivado da resina por reação com ácido acético/trifluoroetanol/diclorometano (1:1:8), por 1 h em temperatura ambiente. A solução foi filtrada e liofilizada. O resíduo oleoso foi dissolvido em uma solução ácido trifluoracético (TFA)/H₂O 95% e mantido por 1 h em temperatura ambiente. Na última etapa, a solução final foi diluída em água e particionada em DCM/H₂O (1:1). A fase aquosa foi liofilizada e purificada por RP-HPLC, em coluna YMC-Pack ODS (20 x 150 mm, Yamamura Kagaku, Kyoto, Japão), utilizando eluição isocrática de 20% ACN/0,1% TFA/H₂O, com fluxo de 7 mL/min. O BDS 391 sintético foi caracterizado por espectrometria de massa, utilizando MALDI-TOF MS e por co-eluição com BDS 391 natural, em equipamento de HPLC acoplado ao espectrômetro de massa ESI-MSMS. Purificação do BDS 391 sintético por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC).

O composto sintético foi ressuspendido em água Milli-Q (Millipore Inc.) e injetado em um sistema de purificação Shimadzu de HPLC constituído por um detector UV-VIS SPD-10A

VP, bombas LC-10AD VP e um sistema controlador SCL-10A VP (Shimadzu Corp., Japão). A amostra foi cromatografada em uma coluna semipreparativa C-18 de fase reversa (10 x 250 mm, 5 μ m; Capcell PAK Shiseido™), através de um gradiente linear de 5 a 55% (em 45min) do solvente “B”, composto de acetonitrila + 0,1% de ácido trifluoroacético (CH₃CN / 0,1% TFA) com fluxo de 1 mL/min durante 50min, através de monitoramento em UV 214 nm. O solvente “A” é composto de 0,1% de TFA em água Milli-Q.

3.2 Determinação dos espectros de massa

Os espectros de massa foram adquiridos utilizando o Etna Maldi-Tof/Pro (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) (Amersham Biosciences, Suécia). No espectrômetro do tipo MALDI-TOF, o ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico (SIGMA, St. Louis, USA) foi empregado como matriz para peptídeos. As amostras e a matriz foram sempre dissolvidas em uma solução de 1:1 de H₂O e acetonitrila e misturadas em igual volume, sendo sempre aplicadas em duplicata nas placas. Laser de nitrogênio a 337 nm foi empregado para ionizar e volatilizar as amostras, com intensidades de 70 a 100% (unidades arbitrárias). Os espectros foram sempre adquiridos em modo reflectron positivo. O equipamento foi operado e os espectros processados através dos programas Etna Maldi Control e Etna Maldi Evaluation, respectivamente, fornecidos pelo fabricante. A calibração do equipamento foi executada antes da análise das amostras, através de verificação de espectros de proteínas e peptídeos padrões fornecida no Calibration Kit for MALDI-TOF MS (Sigma, St. Louis, EUA).

3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 160 - 180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com água e ração “*ad libitum*” em uma sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 $\pm$ 1 °C) e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Os

protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Butantan – CEUAB / Protocolo 803/2011 e pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – CEUA – ICB/USP – Protocolo nº 028, fls 100 do livro 02.

3.4 Indução de hiperalgesia mecânica por prostaglandina E₂ em rato

Este ensaio foi inicialmente utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva do composto sintético, comparativamente a atividade do BDS 391 obtido diretamente da peçonha da anêmona. Para indução de hiperalgesia mecânica, foi preparada uma solução estoque de prostaglandina E₂ (PGE₂) dissolvendo-se 500 µg de PGE₂ em 1 mL de etanol. No momento do uso, essa solução estoque foi novamente diluída em salina estéril. A dose de prostaglandina utilizada foi de 100 ng em 100 µL de salina, administrada por via intraplantar (i.pl.). A hiperalgesia foi avaliada 3 h após a injeção do irritante. Estudos anteriores realizados durante a realização da Dissertação de Mestrado (38), mostraram que animais injetados por via i.pl. com salina ou com salina mais a proporção de etanol utilizada para diluição da PGE₂, (grupo controle), não apresentam alteração significativa do limiar nociceptivo, em comparação com animais naïve.

Para avaliação da sensibilidade dolorosa foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall & Sellito (1957)(88).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após a administração dos agentes hiperalgésicos.

Os resultados foram analisados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.5 Indução de hiperlagesia térmica por Capsaicina

A hiperlagesia térmica foi induzida pela administração de capsaicina por via intraplantar. Para tanto foi preparada uma solução mãe de Capsaicina composta por 90% de água e 10% etanol na concentração de 1 nmol/ μ l. A solução mãe foi novamente diluída em solução salina estéril. A administração de 50 μ L da solução final de capsaicina (1 nmol/pata) foi realizada 30 min após a injeção de BDS 391 ou salina (controle). Animais injetados com salina ou com salina mais a proporção de etanol utilizada para diluição da capsaicina, por via i.pl., foram inicialmente utilizados como controles.

A avaliação da hiperlagesia térmica foi realizada por meio do teste plantar de Hargreaves (89). Esse teste consiste no aquecimento, por meio de fonte de luz infravermelha dirigida, na região plantar da pata posterior do rato, até que o animal apresente o comportamento da retirada da pata ou o aquecimento da pata atinja o limite de tempo predeterminado (tempo de corte de 25,1 s). O parâmetro escolhido é latência para a retirada da pata, expressa em segundos.

Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individual e posicionados sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea, da luz e do calor, durante cinco minutos, para adaptação ao ambiente. Após esse período, uma fonte de luz infravermelha, colocada sob na pata direita traseira do animal, é acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz e o relógio param automaticamente.

O teste foi aplicado antes da administração da capsaicina, com intuito de obter a medida basal, e também nos tempos 2, 15, 30 e 60 min após este tratamento.

3.6 Tratamentos Farmacológicos

❖ BDS 391, diluído em salina, foi administrado por via i.pl., nas doses 15 nM, 150 nM, 1,5 μ M, 15 μ M, 150 μ M/pata. As doses do BDS 391 estão baseadas em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (24, 38).

❖ Ondansetron, antagonista seletivo de receptor 5-HT₃, diluído em salina estéril, foi administrado na dose de 100 µg/pata, por via i.pl., 15 min antes do BDS 391. A dose do ondansetron esta baseada em estudos iniciais realizados em nosso laboratório (Ferreira Junior, W. & Cury, Y., manuscrito em elaboração).

❖ Capsazepina, antagonista seletivo de receptor TRPV1, administrado por via intraplantar, na dose de 30 ou 60 nmol/pata, num volume final de 50 µl (90);

❖ *1-(-m clorofenil)- biguanida*, agonista 5-HT₃ foi utilizado como controle, na dose de 5 µg / pata, administrado por via i.pl. A dose do agonista está baseada em estudos iniciais, realizados em nosso laboratório (38)

3.7 Ensaio de ligação (“Binding”) em receptores serotoninérgicos 5-HT₃

Esta etapa foi desenvolvida no Departamento Fisiologia do Instituto de Biociências – USP, em colaboração com a Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e com a Profa. Associada Dra. Débora Rejane Fior Chadi.

Os ratos foram anestesiados profundamente com dose letal de pentobarbital sódico (Hypnol 3%, Lab. Cristália) para a remoção da região plantar da pata, que foi rapidamente congelada em isopentano (Sigma, USA) e gelo seco à temperatura de -35 °C, ficando armazenada a -80 °C até seu processamento. Cortes de 20 µm de espessura foram retirados em criostato a -24 °C e montados em lâminas previamente tratadas com gelatina (Merck, Alemanha) e cromalium (Merck, Alemanha).

Para o ensaio de ligação dos receptores 5-HT₃, foi utilizado o método descrito por Lummis e colaboradores 2004 e 2005 (50, 91) com algumas adaptações. Resumidamente, a afinidade do receptor 5-HT₃ pelo composto BDS 391 foi determinada por ensaios de competição. Como marcador, foi utilizado o radioligante [³H] GR65630 (PerkinElmer Life Sciences), antagonista específico de receptores 5-HT₃, diluído na solução tampão 1mM HEPES, com pH = 7.4. O experimento consiste na incubação das secções da pata dos animais com

concentrações crescentes do competidor não marcado (BDS 391), juntamente com uma concentração (a ser definida) do ligante radioativo [^3H] GR6563, durante 60 min em temperatura ambiente (25 °C). A ligação não específica do composto radioativo [^3H] GR65630 foi determinada por ensaio de competição com ondansetron, antagonista específico para 5-HT₃, não marcado. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Os parâmetros de ligação dos receptores 5-HT₃ foram determinados ajustando os dados experimentais seguindo a equação:

$$[B] = [B_o] / \{1 + (IC_{50} / [\text{competidor}])^{-n}\}$$

[B] e [Bo] são as concentrações do [^3H] GR65630 na presença e na ausência do competidor não marcado (BDS391 e ondansetron), respectivamente. O IC₅₀ foi determinado como a concentração do ligante competidor capaz de deslocar 50% do radioligante. A constante de inibição (K_i) dos competidores foi estimada pela equação de Cheng-Prusoff (92),

$$K_i = IC_{50} / \{1 + ([L] / K_d)\}$$

na qual [L] e K_d são a concentração e a constante de dissociação do radioligante, respectivamente.

3.8 Cultura de células para estudos eletrofisiológicos

Para os experimentos de imagem de fluorescência da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) e ensaios eletrofisiológicos foram utilizados ratos Wistar machos de 21 dias de vida. Os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 conforme protocolo n° 028 das fls. 100 do livro 2 aprovado pela CEUA-ICB/USP e protocolo no 803//11 aprovado pela CEUAIB – Instituto Butantan. O canal medular foi aberto longitudinalmente e as meninges e a medula espinhal foram removidas. Sob microscópio estereoscópico, os gânglios da raiz dorsal foram removidos cuidadosamente com pinça de ponta fina e depositados em uma placa de Petri contendo 1 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Cultilab) em baixa temperatura. Os gânglios foram então lavados por três vezes em EBSS (Earle's Balanced Salt Solution; concentrações em mM: NaCl 132; KCl 5,3; HEPES 10, NaH_2PO_4 1; glicose 5,5; pH 7,4 ajustado com NaOH). Para a dissociação das células, os gânglios foram submetidos à digestão enzimática por collagenase (1 mg/ml) e em seguida por tripsina (2,5 mg/mL), a 37 °C, respectivamente por 40 e 12 min sob leve agitação. O material foi centrifugado a 2000 rpm por 2 min e o pellet (gânglios) foi suspenso em solução de EBSS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), 1,5 mg/mL de inibidor de tripsina (Sigma-Aldrich) e 5 U/mL de DNase (Sigma-Aldrich). As células foram dispersadas com 3 pipetas Pasteur de vidro, com pontas polidas em chama e diâmetros decrescentes. Após a dissociação, a suspensão foi centrifugada a 2000 rpm, por 2 min e o sobrenadante descartado. O pellet foi disperso em 500 µl de DMEM suplementado com SFB (5%) e antibióticos (estreptomicina e penicilina, 100 UI/ml, Gibco). Gotas (7-10 µl) da suspensão de células foram semeadas em fragmentos de lamínulas de vidro previamente tratado com poli-L-lisina (0,1%). Após a aderência das células, a placa de Petri que continha os fragmentos de lamínula foi inundados com 2,5 mL de DMEM, contendo SFB (5%) e antibióticos (estreptomicina e penicilina, 100UI/ml). A cultura foi mantida em incubadora, a 37 °C, em atmosfera com CO_2 a 5% e umidificada.

3.9 Avaliação da concentração de Cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) por imagem de fluorescência

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Eletrofisiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas / USP, sobre a co-orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Cassola.

As células, obtidas como descrita no item 3.9, aderidas ao suporte de vidro, foram transferidas para uma câmara de perfusão (Warner Instruments, EUA). Uma bomba peristáltica (LKB Instruments, Austrália) introduzia solução Tyrode na câmara e uma bomba de vácuo a aspirava a um fluxo de 3 ml/min. Para estes ensaios utilizamos 4 linhas de perfusão, as quais permitiam eficientes trocas das soluções com os tratamentos. Como o volume da câmara era de ordem de 300 μ l, as trocas de solução eram rápidas. Foi utilizada solução Tyrode de composição (em mM): NaCl 132; KCl 4; $MgCl_2$ 1,2; $CaCl_2$ 1,8; HEPES 10; glicose 5; pH 7,4 ajustado.

Os indicadores lipossolúveis Fluo-4 AM ou Fura-2 AM, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e emulsificados com o detergente Pluronic (Molecular Probes). A solução estoque foi diluída em solução Tyrode na concentração final de 10 μ M. O período da carga das células com o fluoróforo foi de 15 min. Confirmada a carga das células, a solução contendo o indicador era removida da câmara, substituída pela solução fisiológica, sem o fluoróforo. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência invertido (Leica, AF6000, Alemanha) equipado com lâmpada HBO. Para as imagens com fluoróforo Fura 2 foi empregado um sistema rotativo de troca de filtros que permitiu a excitação sequencial em dois comprimentos de onda, 340 nm e 380 nm. A emissão foi observada com um filtro “high-pass” para comprimento de onda acima de 510 nm. (2 Hz). Para as imagens com o fluoróforo Fluo 4, as células foram excitadas com um feixe de luz com comprimento de onda 488 nm e a emissão foi observada em 525 nm. As imagens foram capturadas por uma câmera CCD em séries temporais com intervalos de 3 ms.

Os dados gravados em arquivos digitais foram analisados pelo programa de computador LAS (Leica), que permitiu delimitar, na imagem digital, a região correspondente a cada célula identificável no campo e calcular a intensidade média para os pixels incluídos nesta área. A partir

destes dados, razões foram calculadas com o programa de computador Microsoft Excel (Microsoft Corp). Para os resultados com fluo-4 utilizou-se a razão F/F_0 (intensidade da fluorescência no tempo t sobre intensidade da fluorescência inicial). Para os obtidos com fura-2 a razão utilizada foi F_{340}/F_{380} (Intensidade da fluorescência para excitação a 340 nm sobre intensidade da fluorescência para excitação a 380 nm). Eventuais variações na razão indicam variações na $[Ca^{2+}]_i$.

3.10 Registros Eletrofisiológicos

Estes estudos eletrofisiológicos também foram realizados no laboratório de Eletrofisiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas / USP, sobre a co-orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Cassola. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, entre 20 e 23 °C. Para os registros de corrente, utilizou-se um amplificador Axopatch 200B e o programa Camplex 10.1 da suíte pClamp, v 10.1., ambos da Axon Instruments Inc. Este programa converteu o sinal analógico em digital e vice-versa, fazendo a comunicação entre o amplificador e computador. O sinal de corrente foi filtrado por um filtro “Bessel” de 4 polos, a uma frequência de corte de 2 kHz. A frequência de amostragem foi, na maior parte dos experimentos, de 20 kHz. Antes do início de qualquer experimento, a capacitância era cancelada e realizada a mediada de sua resistência.

Nos ensaios foi utilizada uma câmara de registros, a qual foi desenhada pelo Laboratório de Eletrofisiologia do Departamento de Fisiologia do ICB – USP. Durante os experimentos, a câmara foi continuamente perfundida, por gravidade, com a solução extracelular apropriada, a um fluxo de 1 – 2 mL por minuto. O excesso de solução foi aspirado da câmara por uma bomba de aquário modificada no laboratório. O ajuste da entrada e saída de solução permitiu-nos manter o volume da câmara com oscilações aceitáveis. A aplicação do BDS 391 sobre a célula em observação foi feita por micropipetas de borossilicato com um septo central (capilares “teta”) (Hilgenberg, Malsfeld, Germany). Um dos lados da micropipeta continha uma solução controle e o outro, a solução com BDS 391. A ejeção das soluções foi feita por pressão dada por colunas de mercúrio. Com esse sistema e com a aproximação da ponta dessa micropipeta a uma distância de 1 a 2 vezes o tamanho da própria célula em experimentação, pode-se trocar rapidamente a

composição da solução no microambiente de cada célula. A micropipeta era levada para próximo da célula por micromanipulador.

As células foram observadas em um microscópio invertido, modelo Axiovert 200 (Carl Zeiss, Inc. Alemanha), equipado com sistema óptico de contraste por interferência diferencial (DIC). As objetivas usadas foram de 10, 20 e 40 x e as oculares, de 10 x (Carl Zeiss, Inc. Alemanha). O microscópio e micromanipuladores (MHW-3, Narishige, USA) estavam sobre mesa com suspensão pneumática, modelo MICRO-G 63-531 (Technical manufacturing Co., EUA) para amortecimento das vibrações. Os experimentos foram realizados em gaiola de Faraday, com nível de ruído elétrico satisfatório.

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas semanalmente e armazenadas em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A preparação foi feita sempre com água Mili-Q. As composições destas soluções são mostradas na tabela abaixo.

Solução Externa	
Componente	Concentração (mM)
TEA Cl	132
BaCl ₂	5
CaCl	2
KCl	4
HEPES	10
MgCl ₂	1,2

Solução Interna	
Componente	Concentração (mM)
CsCl	135
HEPES	10
ATP Mg	4
GTP Li	0,1
Creatina P	10
EGTA	10

Correntes de Ca^{2+} por canais dependentes de voltagem foram observadas pela técnica “patch clamp” na configuração “whole cell”. Diferentes protocolos de pulsos de voltagens foram utilizados conforme a informação pretendida. Como padrão, o potencial de “holding” ou de manutenção, foi de -110 mV para todos os experimentos. Neste potencial, a probabilidade dos canais estarem no estado aberto é nula.

Em todos os experimentos procedeu-se ao cancelamento da capacitância. O erro na voltagem de membrana introduzido queda ôhmica na resistência de acesso foi compensado em no mínimo 90%.

A capacitância estimada de cada célula foi utilizada para a determinação aproximada do seu diâmetro. Supondo-se uma geometria esférica para as células e assumindo que a capacitância específica de membranas celulares é de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (93), pode-se calcular o diâmetro das células pela equação:

$$D_c = 10\sqrt{C_m/\pi}$$

onde, D_c é o diâmetro da célula em questão em μm e C_m é a capacitância de membrana em picroFarads (pF).

3.11 *Análises Estatística*

Para os ensaios comportamentais, a análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (94) associado ao teste de Tukey (95), para comparação de mais de duas médias. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

Nos experimentos de imagem da concentração de ions cálcio intracelular, os dados são apresentados como média e (n) é o número de observações. Comparações entre dois grupos de dados foram feitas por teste “t” de “Student” pareado ou não pareado, de acordo com os dados, pela utilização do programa de computador Microsoft Excel® (Microsoft Corp.). Dois grupos de dados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de “p”, correspondente ao valor de “t” crítico, for $< 0,05$.

As correntes por condutâncias ôhmicas, não modificadas por voltagem (“leak currents”) foram estimadas pelo protocolo P/N (96) e subtraídas “on-line” das correntes totais. Os dados gravados em disco rígido de computador foram analisados pelo programa de Clampfit 10.1 da suíte pClamp 10, Axon Instruments. Aos dados experimentais foram ajustadas equações derivadas de modelos, utilizando-se o programa de computador Origin 9.1 (Microcal Software, Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 Síntese do BDS 391

Neste processo, foi obtido o composto sintético análogo ao natural em quantidades significativas para realização dos ensaios moleculares (Figura 7).

Figura 7: Síntese do composto BDS 391. O produto sintético foi obtido por um sintetizador de peptídeos automatizado MAPS-8 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), pelo método de fase sólida.

A Figura 8 representa uma cromatografia de fase reversa de uma injeção analítica do composto 6Br-IAA-His (grupo indol com um molécula de Bromo na posição 6 conectado a um resíduo de histidina) ou BDS 391 sintético. Está etapa foi realizada para confirmar a pureza do

composto sintético. As escalas das ordenadas mostram as unidades arbitrárias de absorbância a 214 nm (esquerda) e o percentual de solvente B (direita) empregado na purificação.

Figura 8 - Cromatograma representativo de uma recromatografia do composto 6Br-IAA-His (BDS 391). A linha verde (% B) representa a variação do gradiente empregada. Empregou-se um gradiente linear de 5 a 55% de solvente B (CH_3CN / 0,1% TFA) a um fluxo de 2,5 mL/min durante 45min..

Para confirmar a estrutura e grau de pureza do composto sintético o material foi analisado por espectrometria de massa. Os experimentos foram realizados em um equipamento ESI Q-ToF API Ultima (Micromass, Reino Unido). Os resultados mostram claramente dois picos de massa molecular com $(\text{M}+\text{H})^+$ em 391 e 393, demonstrando que a molécula contém um átomo de bromo (Figura 9).

Figura 9: Espectro ESI-MS de BDS 391.

4.2 Efeito antinociceptivo do BDS 391 sintético

Para confirmar a atividade antinociceptiva do composto BDS 391 sintético (6Br-IAA-His), avaliamos o efeito antinociceptivo do composto no modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂. Os resultados mostram que a PGE₂ acarretou hiperalgesia, representada pela diminuição do limiar nociceptivo, quando comparado com a medida basal (linha tracejada, Figura 10). A administração intraplantar do BDS 391 sintético (150 nM), de maneira análoga ao observado para o composto natural, reverteu a hiperalgesia induzida por PGE₂, além de acarretar aumento do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal, obtida antes de qualquer tratamento (Figura 10). O Ondansetron (6 µM), antagonista do receptor 5HT₃, reverteu o efeito

antinociceptivo do BDS 391 sintético e também do composto natural, indicando o envolvimento destes receptores na ação deste composto. Estes resultados em conjunto, sugerem que o composto sintético apresenta as mesmas atividades detectadas para o BDS 391 obtido diretamente da peçonha das anêmonas. Baseado nesses resultados, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando o composto sintético.

Figura 10: Efeito do BDS 391 sintético sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂). A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada pelo teste de pressão da pata de ratos. Para a indução de hiperalgesia, os animais foram tratados com Prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng/pata). O BDS 391 sintético (6BrIAA-His), na dose de 150 nM, foi administrado por via i.pl. 150 min. após a PGE₂. O Ondansetron (6μM) foi administrado 15 min. antes o BDS 391 sintético. Como controle foi utilizado BDS 391 natural ou salina, administrados por via i.pl., nas mesmas condições experimentais. O teste de pressão de patas foi aplicado antes (linha tracejada) e 180 min. após a administração de PGE₂. Os resultados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo. *p < 0,05 por comparação com a medida basal (linha tracejada) antes do tratamento, #p < 0,05 por comparação com o grupo salina.

4.3 Ensaio de ligação (“Binding”) do BDS 391 a receptores 5-HT₃

Apesar dos resultados farmacológicos evidenciarem a participação de receptores do subtipo 5-HT₃ no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391, os resultados obtidos nos ensaios de ligação, mostraram que o BDS 391, na maior dose avaliada (1 μM), não foi capaz de deslocar a ligação do radioligante [³H] GR65630 (0,69 nM) antagonista seletivo de receptores 5-

HT₃. Estes dados sugerem que o efeito do BDS 391 não é decorrente de uma ação direta sobre os receptores 5-HT₃.

Figura 11 – Ensaio de ligação (“binding”) do BDS 391 a receptores 5-HT₃. O BDS 391 (1µM) não interferiu significativamente com a ligação do radioligante. Respostas significativas são determinadas quando o composto é capaz de deslocar o radioligante [³H] GR-65630, demonstrando afinidade pelo receptor 5-HT₃.

4.4 Efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina.

Baseado nestes resultados, iniciamos nova etapa de estudos com a intenção de investigar os possíveis alvos farmacológicos do BDS 391. Uma vez que a literatura tem apontado os canais TRPV1 como potenciais alvos farmacológicos para processo de geração e modulação da dor e também estudos demonstrando que os canais TRPV1 estão coexpressos com os receptores 5-HT₃ nas fibras nociceptivas, avaliamos, inicialmente, o efeito antinociceptivo do BDS 391 em um modelo de nocicepção resultante da ativação de canais TRPV1. Para tanto avaliamos o efeito do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina.

A administração intraplantar de capsaicina acarretou, em comparação com a mediada basal, diminuição do limiar nociceptivo em reposta a um estímulo térmico nocivo (teste de Hargreaves) (89). Essa hiperalgesia térmica foi detectada pelo menos até 60 min após a injeção

de capsaicina. A administração intraplantar do BDS 391 sintético (15 nM, 150 nM, 1,5 μ M, 15 μ M/pata), 30 min. antes da capsaicina, inibiu esse fenômeno (Figura 12).

Figura 12: Efeito do BDS 391 sintético sobre a hiperalgesia térmica induzida por capsaicina. A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada pelo tempo de exposição ao estímulo térmico (s). Para a indução de hiperalgesia, os animais foram tratados com Capsaicina (Caps, 1 nmol/ μ L). O BDS 391 sintético (6BrIAA-His), nas doses de 15 nM, 150 nM, 1,5 μ M e 15 μ M, foi administrado por via i.pl. 30 min. antes da Capsaicina. Como controle foi utilizado salina administrada por via i.pl., nas mesmas condições experimentais. O teste de Hargreaves foi aplicado antes (tempo 0), 15, 30 e 60 min. após a administração de Capsaicina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina.

4.5 Envolvimento do receptores 5-HT₃ no efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina.

Uma vez confirmado o efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida por capsaicina, investigamos o envolvimento de receptores 5-HT₃, utilizando antagonista seletivo deste receptor, o ondansetron. O antagonista de receptores 5HT₃ reverteu o efeito antinociceptivo do BDS 391. Interessantemente, o ondansetron, per se, reverteu a hiperalgesia induzida por capsaicina, no tempo de 2 min (Figura 13).

Figura 13 - Envolvimento de 5-HT₃ no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391. A sensibilidade dolorosa dos animais foi avaliada pelo tempo de exposição ao estímulo térmico (s). Para a indução de hiperálgia, os animais foram tratados com Capsaicina (Caps, 1 nmol/μL). O BDS 391 sintético (6BrIAA-His), na concentração de 1,5 μM, foi administrado por via i.pl. 30 min. antes da Capsaicina. O ondansetron foi administrado na dose de 100 μg/pata, por via i.pl., 15 min. antes do BDS 391. O teste de Hargreaves foi aplicado antes (tempo 0), 2, 15, 30 e 60 min. após a administração de Capsaicina. Os resultados representam a média dos valores obtidos ± EPM. * P < 0,05, ao comparar com o grupo BDS 391 + capsaicina. #P < 0,05 em comparação com o grupo tratado com capsaicina.

4.6 Efeito do BDS 391 sobre o influxo de íons Cálcio induzido pela tratamento com KCl em culturas de neurônios do DRG.

A aplicação da solução iônica de cloreto de potássio (KCl) em cultura celular de neurônios do DRG induz a alteração no potencial de membrana dos neurônios acarretando a abertura de canais dependentes de voltagem e influxo de Ca²⁺ (Figura 14). O composto BDS 391 (1,5 μM), não interferiu com o influxo de cálcio evocado pelo KCl (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido por capsaicina em neurônios No eixo das ordenadas esta representada a variação, em tempo real, do influxo de Ca^{2+} em neurônios do DRG (determinado pela razão das fluorescências detectadas em 340 e 380 nm. No eixo das abscissas está representado o tempo após a administração dos fármacos. O KCl foi utilizado como controle positivo. $n = 80$ células.

4.7 Ação do BDS 391 sobre correntes de íons Cálcio em neurônios do DRG de ratos

Para corroborar resultados apresentados anteriormente, de que o BDS 391 não é capaz de interferir diretamente com canais dependentes de voltagens expressos nos neurônios do gânglio da raiz dorsais de ratos e também com intuito de ampliar a caracterização dos mecanismos envolvidos no efeito analgésico induzido pelo BDS 391, buscamos avaliar se o composto BDS 391 é capaz de bloquear canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cavs). Para tanto foram realizados experimentos eletrofisiológicos em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) de

ratos. Estes experimentos de isolamento da corrente para o cálcio foram cuidadosamente realizados, evitando-se a interferência do íon sódio nos registros.

Inicialmente foram construídas relações corrente-voltagem (relações I-V) para valores de pico de correntes de Ca^{2+} (Figura 15). O potencial de reversão das correntes (V_r), o potencial de membrana no qual a condutância a Ca^{2+} é a metade da condutância máxima ($V_{0,5}$) e o “steepness” (k) da relação entre condutância e voltagem foram estimados pelo ajuste da função composta Ohm-Boltzmann aos pontos:

$$I_{Na^+}^V = (V_m - V_r) \times \left(\frac{G_{Na^+}^{max}}{1 + e^{\frac{(V_{0,5} - V_m)}{k}}} \right)$$

Figura 15 – Relação I – V foi obtida através da função de Ohm-Boltzmann ajustada aos valores obtidos por um protocolo de pulsos de voltagem. A linha preta representa os dados obtidos e a linha vermelha representa soluções numéricas das equações que melhor se superpõem aos pontos.

O efeito do BDS 391 sobre as correntes de Ca^{2+} foi observado em sucessão de pulsos retangulares, com frequência de 0,2 Hz, para 0 mV, de um potencial de “holding” de – 110 mV. Após um período controle, procedeu-se à rápida aplicação do BDS 391, retornando-se em seguida à condição controle. O composto BDS 391 não alterou as correntes de Ca^{2+} . Este

resultado corrobora os resultados obtidos anteriormente nos ensaios de influxo de Ca^{2+} , mostrando que o BDS 391 não é capaz de interagir diretamente com os Cavs. (Figura 16 e 17).

Figura 16 – Bloqueio das correntes de Ca^{2+} pelo BDS 391. Traço preto representa o registro de corrente de Ca^{2+} controle e o traço vermelho representa o registro de corrente de Ca^{2+} sob efeito do BDS 391 (n = 7 células).

Figura 17 – Interação do BDS 391 com Cavs. O gráfico (traço azul) mostra a média das correntes de Ca^{2+} ($n = 7$ células) em neurônios, induzidas por meio de pulsos de voltagem. Os registros foram obtidos antes do tratamento com BDS 391 (ctrl), durante o aplicação do BDS 391 (BDS 391) e após a retirada do composto por meio de troca contínua da solução banho (ctrl).

4.8 Efeito do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina

Nesta etapa investigamos a possível ação do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina em neurônios do DRG.

As células do DRG dispersas foram observadas em microscopia de transmissão, utilizando microscópio equipado com óptica de contraste por interferência diferencial (Differential interference contrast, DIC). Nesta análise foi possível identificar o corpo celular dos neurônios sensoriais com formato esférico e processos e, às vezes, o núcleo (Figura 18). Na Figura 19 podemos observar o aspecto da cultura de neurônios 24 h após a sua dispersão (presença de células da glia).

Para a realização dos ensaios de influxo de Ca^{2+} os neurônios foram tratados com os fluoróforos (Fluo-4 ou Fura-2) por aproximadamente 20 min antes do início dos registros.

Figura 18 – Neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos em cultura, 4 h após a dispersão. À esquerda, imagem de transmissão, onde são observados diversos neurônios (seta azul) e algumas células satélites (glia – seta vermelha). À direita, imagem de fluorescência de células tratadas com Fluo-4. A escala nas duas figuras indica 10 μm .

Figura 19 – Neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos (DRG) em cultura, 24 h após a dispersão. A - Imagem de transmissão onde há diversos neurônios (seta azul) e células da glia (seta vermelha). B e C - Imagem de fluorescência de células tratadas com Fura-2 e excitadas em dois diferentes comprimentos de onda, respectivamente 340 e 380 nm. C – Razão da fluorescência emitida pelas células R340/R380. A escala nas duas figuras indica 20 µm.

Como o equipamento disponível dispunha de fontes de laser no espectro visível, utilizou-se o indicador fluo-4, com as devidas precauções para distinguir alterações de intensidade de fluorescência por variações na concentração de Ca^{2+} , daquelas por perda do fluoróforo. Aplicação de capsaicina, na concentração de 30 nM induziu aumento na intensidade de fluorescência dos neurônios devido à elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O aumento é transitório e a fluorescência decai aos valores precedentes, assim que a preparação é lavada, sendo totalmente substituída a solução Tyrode com capsaicina pela solução sem capsaicina. Este efeito indica a expressão de canais TRPV1 nos neurônios do DRG, uma vez que o BCTC (4-(3-Cloro-2-piridinil)-N-[4-(1,1-

dimetiletil)fenil]-1-piperazinicarboxamida), um antagonista seletivo para TRPV1, aplicado junto com a capsaicina, foi capaz de inibir o aumento induzido pela capsaicina (Figura 20). Das células analisadas (células contadas dentro do campo visual do microscópio), aproximadamente 45 a 55% (n=168) expressam os canais TRPV1. O BDS 391, na concentração 1,5 μM , bloqueou o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina. O bloqueio acarretado pelo BDS 391 foi detectado em aproximadamente 80% das células que responderam à capsaicina (Figura 21).

Figura 20 – Imagem de fluorescência de Ca^{2+} com fura-2. Resposta dos neurônios a aplicação de capsaicina, seguida da aplicação de BCTC + capsaicina e uma nova aplicação de capsaicina após lavagem do BCTC. O KCl 50 mM foi utilizado como controle positivo.

Figura 21 – Imagem de fluorescência de Ca^{2+} com fluo-4. Resposta dos neurônios a capsaicina. Traço Vermelho é representativo de uma célula que não respondeu ao estímulo da capsaicina (n = 36). Traço Verde é representativo dos neurônios que responderam a capsaicina porém não responderam ao BDS 391 (n = 7). Traço azul é representativo dos neurônios que respondem a capsaicina e que foram bloqueados pelo BDS 391 (n = 38). O KCl 50 mM foi utilizado como controle positivo.

Para confirmar os resultados obtidos com o Fluo-4, foram repetidos os ensaios utilizando o fluoróforo Fura-2. Como a formação do complexo Ca^{2+} - Fluo-4 não modifica os comprimentos de onda de excitação ou de emissão, não é possível calcular razões, podendo-se presumir que modificações na fluorescência se devam a outras variáveis – perda de fluoróforo, por exemplo – além de modificações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Na Figura 22 está representada a série temporal das razões de fluorescência para excitação nos dois comprimentos de onda, R_{340}/R_{380} . Os resultados foram obtidos após a aplicação de 3

pulsos consecutivos de capsacina, com intervalos de 5 min. Na Figura 22B, está representada a aplicação do pulso de BDS 391 + capsaicina, intercalando 2 pulsos de capsaicina. Os resultados mostram que não houve dessensibilização dos neurônios após 3 aplicações consecutivas de capsaicina e que o composto BDS 391 inibiu o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsicina. A solução de KCl 50 mM foi utilizada como controle. Qualitativamente o curso temporal da fluorescência é semelhante ao que se observa com o indicador fluo-4.

Figura 22 – Imagem de fluorescência de Ca^{2+} com fura-2. **A** - Resposta dos neurônios a 3 aplicações consecutivas de capsaicina. **B** - Resposta dos neurônios a aplicação do BDS 391 + Capsaicina. O KCl 50 mM foi utilizado como controle positivo.

5 DISCUSSÃO

As anêmonas do mar utilizam suas potentes toxinas para paralisar presas e/ou para se defenderem de predadores. Dentre estas toxinas, destacam-se os peptídeos neurotóxicos (3000 a 6000 Da), que agem modulando canais iônicos (97, 98), e proteínas (~ 20000 Da) com atividade hemolítica (5, 19, 99, 100). Além destas toxinas, alguns compostos de baixo peso molecular foram também isolados da peçonha de anêmonas do mar (22, 101); contudo, a atividade biológica destes compostos não foi ainda totalmente caracterizada. Recentemente, foram isolados compostos bromados e de baixo peso molecular da peçonha de *Bunodosoma cangicum*, espécie encontrada no litoral Brasileiro. Estudos iniciais, realizados pelo nosso grupo, mostraram que um destes compostos, o BDS 391 é capaz de acarretar efeito antinociceptivo em modelos de hipernocicepção aguda e crônica, e de nocicepção manifesta. Estudos farmacológicos evidenciaram que receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT₃ estão envolvidos na ação antinociceptiva do BDS 391, nos modelos avaliados. Assim o objetivo deste estudo foi ampliar a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos neste efeito.

Para a realização destes estudos, houve a necessidade da obtenção de maiores quantidades do composto, o que não era possível pelos processos usuais de obtenção a partir da peçonha natural. Assim em colaboração com o Prof. Katsuhiko Konno, da Universidade de Toyama, Japão, foi obtido o BDS 391 sintético. Os estudos iniciais mostram que o BDS 391 sintético - 6-BrIAA-His - induz, da mesma forma que o observado para o composto obtido diretamente da peçonha da anêmona, efeito antinociceptivo mediado pela ativação de receptores 5-HT₃ periféricos (Figura 10). Novamente, os resultados ora obtidos, confirmando que o efeito antinociceptivo do BDS 391 é mediado por receptores 5-HT₃, reforçam a importância do BDS 391 como ferramenta para o entendimento da atividade destes receptores, na periferia, como moduladores dos processos nociceptivos.

Como mencionado na Introdução, dados de literatura tem mostrado que a participação destes receptores na transmissão do estímulo doloroso e seu controle é, ainda, bastante controverso (37, 87) e dependente da localização destes receptores, assim como o modelo de nocicepção utilizado (30). Assim, com intuito de ampliar a caracterização da ação do BDS 391

nestes receptores, foi avaliada a possível interação deste composto com o receptor 5-HT₃, por meio de ensaio de ligação (“*binding*”). Nossos resultados mostraram que o BDS 391 não é capaz de deslocar o radioligante [³H] GR6563, antagonista seletivo para o receptor 5-HT₃ (Figura 11), sugerindo que este composto não se liga, diretamente, a este receptor.

É importante lembrar que os receptores 5-HT₃, diferentemente dos demais receptores para serotonina, são canais iônicos ativados por ligantes. Estudos demonstram que existem 5 diferentes subtipos de monômeros (5-HT_{3A-E}), porém apenas os canais pentâmeros homoméricos (5-HT_{3A}) ou heteroméricos (5-HT_{3AB}) são funcionais (30, 102). Os possíveis alvos e sítios de ligações do receptor 5-HT₃ estão apresentados na Figura 23 (52). No presente estudo, foram também realizados novos ensaios de “*binding*” (preliminares), em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dra. Sarah Lummis do Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge, Reino Unido, visando avaliar a possível interação com os receptores homoméricos 5-HT_{3A} e 5-HT_{3AB}. Os resultados (dados não mostrados) mostraram que o BDS 391 não é capaz de deslocar o ganisetron, antagonista radioligante seletivo para o receptor homomérico 5-HT_{3A}. Contudo, resultados também preliminares, indicaram que o BDS 391 poderia se ligar à interface do receptor heteromérico 5-HT_{3AB} (esquema Figura 24), uma vez que em alta concentração (100 µM), o BDS 391 foi capaz de deslocar o radioligante seletivo para o receptor heteromérico 5-HT_{3AB}.

Figura 23 – Diferentes sítios de ligação do receptor 5-HT₃. Modificado de Walstab J., Rappold G., e Niesler B, 2010 (52).

Figura 24 – Desenho representativo, indicando a possível interação do composto BDS 391 com o receptor heteromérico 5-HT_{3AB}.

Baseado nos resultados obtidos sobre a possível interação do BDS 391 com receptores heteroméricos (5-HT_{3AB}) por ensaios de ligação (*“binding”*), foi estabelecida colaboração com o Prof. Dr. Anders A. Jensen do Departamento de Farmacologia e Desenho de Drogas da Universidade de Copenhague, Dinamarca. O grupo de pesquisa do Prof. Anders realiza estudos sobre estrutura/função dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT₃ (103, 104). Foram realizados, pelo referido professor, ensaios empregando a técnica de *“FLIPR Membrane Pontecial Assay”* (FMP) (105). Nestes ensaios foi avaliada a possível ação do composto BDS 391 (150 µM) como agonista ou antagonista para os receptores 5-HT_{3A} e 5-HT_{3AB}. Os resultados (dados não apresentados) demonstraram que o BDS 391 não apresenta atividade agonista ou antagonista sobre os receptores 5-HT_{3A} e 5-HT_{3AB}. Estes resultados corroboram a hipótese de que o BDS 391 não é capaz de interagir diretamente com os receptores 5HT₃ e que envolvimento destes receptores no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391 ocorre de forma indireta.

Há evidências crescentes de que algumas ações da serotonina estão relacionadas com funções do receptor TRPV1 (64, 106). Ainda estudos tem relatado a co-expressão de receptores 5-HT e TRPV1 em neurônios do gânglio trigeminal (TG), bem como a capacidade da serotonina de aumentar o acúmulo de Ca²⁺ em neurônios sensíveis a capsaicina presente no TG de ratos.

Ainda, dados de literatura tem mostrado que a serotonina aumenta a excitabilidade da membrana do neurônio sensorial a estímulos térmicos e a corrente de cálcio produzida por capsaicina e calor (63, 64, 107). A serotonina também aumenta a liberação, produzida pela capsaicina, de peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), mas não é capaz de interferir por si na liberação deste peptídeo (108). Por outro lado, tem sido observado que a depleção de 5HT atenua a dor visceral por redução na ativação de TRPV1(109). Baseado nesses dados, foi presentemente investigado o possível efeito antinociceptivo do BDS 391 no modelo de hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina, um agonista destes canais. Baseado nos resultados mostrando que (a) o BDS 391 reverte o quadro hiperalgésico induzido pela capsaicina (figura 12) e (b) que este efeito é mediado por receptores para serotonina do subtipo 5-HT₃ (Figura 13), e com o intuito de ampliar a caracterização do envolvimento dos receptores TRPV1 na ação do BDS 391, avaliamos se o composto isolado da anêmona do mar é capaz de inibir o influxo de Ca²⁺ induzido pela aplicação de capsaicina, em neurônios do DRG. Para tanto foi utilizado a técnica de Imageam de Fluorescência, empregando dois diferentes indicadores de fluorescência (Fluo 4 e Fura 2/AM) que detectam alterações na concentração intracelular de Ca²⁺.

Os dados obtidos mostrando que o BDS 391, administrado juntamente com a capsaicina, inibe o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ induzido pelo irritante (Figura 20 e 21), sugerem que o composto é capaz de bloquear o influxo do íon Ca²⁺ provavelmente por uma possível ação sobre o canal iônico TRPV1, presente nas fibras aferentes periféricas. Este mecanismo poderia ter ação relevante para o efeito antinociceptivo observado in vivo.

Os resultados apresentados até este momento indicam que o efeito antinociceptivo do composto BDS 391 é mediado pela modulação dos receptores 5-HT₃ e TRPV1, que são canais iônicos ativados por ligante. Desta maneira, para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391, foram realizados estudos para avaliar se o composto BDS 391 é capaz de interferir diretamente com a atividade da fibra nervosa aferente, investigando sua ação em correntes iônicas. Para tanto, foram realizados ensaios de imagem de fluorescência, utilizando uma solução salina com elevada concentração de KCl (20 mM) e também, estudos eletrofisiológicos.

Nos estudos de imageamento, foi observado que o influxo de Ca^{2+} induzido pelo KCL (Figura 14) e consequente à alteração do potencial eletroquímico da membrana celular não foi alterado pelo BDS 391, em nenhuma das concentrações estudadas.

Ainda com o intuito de ampliar a caracterização do BDS 391 sobre os canais dependentes de voltagem, investigamos por meio de estudos eletrofisiológicos, a possível ação direta deste composto sobre canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes em neurônios do gânglio da raiz dorsal. Utilizando protocolos de pulsos de voltagem retangulares (“voltage clamp”) foi possível observar a corrente isolada de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cavs) presente na membrana celular dos neurônios, como demonstrado na curva da relação I-V apresentada na figura 15. Nossos resultados confirmaram que o BDS 391 não é capaz de interferir com a corrente isolada de Ca^{2+} em neurônios do DRG de ratos (Figura 16 e 17). Estes dados sugerem que o BDS 391 não exerce ação direta sobre canais de cálcio dependentes de voltagem.

Estes resultados indicam que o efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391 não é, provavelmente, resultado da ação direta do BDS 391 sobre canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cavs). Os canais para cálcio tem importância funcional tanto na geração e propagação do potencial de ação, quanto para a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (110-112). É bem conhecido na literatura que muitos dos fármacos analgésicos em uso atualmente, como os analgésicos opióides (morfina) ou Prialt (fármaco desenvolvido a partir da peçonha animal do *Connus magus*) induzem analgesia por bloquearem indireta ou diretamente, respectivamente, o influxo de Ca^{2+} nos neurônios (113-115).

Baseado nos dados obtidos até o momento, mostrando que (1) o BDS 391 induz efeito antinociceptivo na hiperalgesia térmica acarretada por capsaicina, um agente ativador de receptores TRPV1; (2) este efeito analgésico é bloqueado pelo ondansetron, um antagonista seletivo 5-HT₃. (3) o composto BDS 391 inibe o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina, em neurônios do DRG e (4) o BDS 391 não é capaz de atuar diretamente em Cavs; e em dados de literatura evidenciando interação entre receptores serotoninérgicos e TRPV1, co-expressão entre receptores 5-HT₃ e TRPV1 em neurônios sensitivos (ver esquema representado na Figura 25) e que a serotonina modula os níveis de Ca^{2+} intracelular em neurônios sensíveis a capsaicina (63, 64), formulamos a hipótese de que o BDS 391 é capaz de interagir diretamente com os canais

TRPV1. Para tanto foi investigado o efeito do BDS 391 sobre o influxo de cálcio induzido pelo tratamento com capsaicina em cultura celular transfectadas (HEK293t) expressando canais TRPV1. Esses estudos foram realizados pela pós-doutoranda Elisangela Bressan, no Instituto de Fisiologia e Patofisiologia, Universidade Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Alemanha. A metodologia empregada foi similar à descrita no item 3.11 no Material e Métodos. Estes ensaios demonstraram que o composto BDS 391 “per se”, não altera a concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, todavia, inibe o influxo de Ca^{2+} em cultura celular HEK 293 transfectada com hTRPV1. Estes resultados corroboram a hipótese de que o composto BDS 391 é capaz de interagir diretamente com canais TRPV1. Foi ainda observado, por meio de ensaios de ELISA, utilizando pele de das patas traseiras de camundongos C57BL/6 e de camundongos modificados geneticamente (TRPV1 deficientes), que o BDS 391 inibe a liberação do CGRP (“calcitonin gene-related peptide”) induzida por bradicinina (anexo).

Figura 25 – Desenho mostrando da interação entre receptores TRPV1 e 5-HT₃ expressos nas fibras aferentes periféricas. Figura obtida no site: <http://www.physiologie1.uni-erlangen.de/de/Reeh/index.shtml>

Nossos dados em conjunto, sugerem ação do BDS 391 sobre os canais TRPV1 e indicam que o efeito antinociceptivo do BDS 391 pode, pelo menos em parte, estar relacionado a ação como antagonista sobre os canais TRPV1. Estes resultados são interessantes uma vez que estudos recentes(116, 117) têm mostrado que moléculas de baixo peso molecular, similares à toxina BDS 391, tem sido caracterizadas como potenciais antagonistas de canais TRPV.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados indicam que o BDS 391, um composto antinociceptivo de baixo peso molecular obtido a partir da peçonha da anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*, não é capaz de interagir diretamente com receptores serotoninérgicos do tipo 5HT3 e que o envolvimento destes receptores na ação antinociceptiva deve resultar de uma ação indireta deste composto nestes receptores. Os resultados sugerem ainda ação do BDS 391 sobre os canais TRPV1 e indicam que o efeito antinociceptivo do BDS 391 pode, pelo menos em parte, estar relacionado à ação deste composto como antagonista sobre os canais TRPV1.

É importante ressaltar que grande parte dos estudos realizados na área de Toxinologia refere-se à caracterização bioquímica e farmacológica de moléculas proteicas e polipeptídios. Assim, a caracterização da atividade biológica do BDS 391, um composto não peptídico e de baixo peso molecular, evidencia a importância da ampliação dos estudos das ações destes compostos de baixo peso molecular presente nas mais diversas fontes animais.

REFERÊNCIAS *

1. Turk T, Kem WR. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. 2009;54(8):1031-7.
2. Watson GM, Hessinger DA. Cnidocyte mechanoreceptors are tuned to the movements of swimming prey by chemoreceptors. *Science*. 1989;243(4898):1589-91.
3. Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Oliveira JS, Richardson M, Pimenta DC, Konno K, et al. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2008;3(3):219-25.
4. Oliveira JS, Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Konno K, Shida CS, Richardson M, et al. BcIV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BcIII. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1764(10):1592-600.
5. Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, et al. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(32):33323-35.
6. Lanio ME, Morera V, Alvarez C, Tejuca M, Gomez T, Pazos F, et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 2001;39(2-3):187-94.
7. Hong Y, Ohishi K, Inoue N, Kang JY, Shime H, Horiguchi Y, et al. Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not *Clostridium septicum* alpha-toxin. *Embo J*. 2002;21(19):5047-56.
8. Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, et al. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(49):32697-707.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 July 2015]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Yan L, Herrington J, Goldberg E, Dulski PM, Bugianesi RM, Slaughter RS, et al. Stichodactyla helianthus peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1513-21.
10. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(47):37137-49.
11. Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, et al. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13942-7.
12. Beeton C, Chandy KG. Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2005;11(6):550-62.
13. Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, et al. Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*. 2001;166(2):936-44.
14. Baell JB, Huang DC. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochemical pharmacology*. 2002;64(5-6):851-63.
15. Andreev YA, Kozlov SA, Koshelev SG, Ivanova EA, Monastyrnaya MM, Kozlovskaya EP, et al. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem*. 2008;283(35):23914-21.
16. Malpezzi EL, de Freitas JC, Muramoto K, Kamiya H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. 1993;31(7):853-64.
17. Norton RS. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*. 1991;29(9):1051-84.
18. Araque A, Urbano FJ, Cervenansky C, Gandia L, Buno W. Selective block of Ca(2+)-dependent K⁺ current in crayfish neuromuscular system and chromaffin cells by sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom. *J Neurosci Res*. 1995;42(4):539-46.
19. Lagos P, Duran R, Cervenansky C, Freitas JC, Silveira R. Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(7):895-902.

20. Cunha RB, Santana AN, Amaral PC, Carvalho MD, Carvalho DM, Cavaleiro EA, et al. Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon*. 2005;45(2):207-17.
21. Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., de Oliveira JS, Konno K, Richardson M, Schiavon E, et al. Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon*. 2008;51(7):1303-7.
22. Garateix A, Flores A, Garcia-Andrade JM, Palmero A, Aneiros A, Vega R, et al. Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon*. 1996;34(4):443-50.
23. Dominguez-Perez D, Diaz-Garcia CM, Garcia-Delgado N, Sierra-Gomez Y, Castaneda O, Antunes A. Insights into the toxicological properties of a low molecular weight fraction from *Zoanthus sociatus* (Cnidaria). *Marine drugs*. 2013;11(8):2873-81.
24. Zaharenko AJ, Picolo G, Ferreira WA, Jr., Murakami T, Kazuma K, Hashimoto M, et al. Bunodosine 391: an analgesic acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *J Nat Prod*. 2011;74(3):378-82.
25. Adam KR, Weiss C. Distribution of 5-hydroxytryptamine in scorpion venoms. *Nature*. 1959;183(4672):1398-9.
26. Jaques R, Schachter M. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent, slow contracting substance in wasp venom. *Br J Pharmacol Chemother*. 1954;9(1):53-8.
27. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. 2009;13(5):441-7.
28. Fozard JR. Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology*. 1984;23(12B):1473-86.
29. Zhang YQ, Gao X, Ji GC, Huang YL, Wu GC, Zhao ZQ. Expression of 5-HT1A receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain*. 2002;98(3):287-95.
30. Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W. The neuronal 5-HT3 receptor network after 20 years of research--evolving concepts in management of pain and inflammation. *European journal of pharmacology*. 2007;560(1):1-8.

31. Aira Z, Buesa I, Salgueiro M, Bilbao J, Aguilera L, Zimmermann M, et al. Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 2010;168(3):831-41.
32. Liu MY, Su CF, Lin MT. The antinociceptive role of a bulbospinal serotonergic pathway in the rat brain. *Pain*. 1988;33(1):123-9.
33. Lin Q, Peng YB, Willis WD. Antinociception and inhibition from the periaqueductal gray are mediated in part by spinal 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276(3):958-67.
34. Granados-Soto V, Arguelles CF, Rocha-Gonzalez HI, Godinez-Chaparro B, Flores-Murrieta FJ, Villalon CM. The role of peripheral 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*. 2010;165(2):561-8.
35. Kesim M, Duman EN, Kadioglu M, Yaris E, Kalyoncu NI, Erciyes N. The different roles of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. *J Pharmacol Sci*. 2005;97(1):61-6.
36. Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, et al. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*. 2002;22(3):1010-9.
37. Sommer C. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Current pain and headache reports*. 2006;10(2):101-6.
38. Ferreira-Júnior WA. Caracterização da ação molecular da Bunodosina 391, composto analgésico obtido da peçonha da anêmona *Bunodosoma cangicum* [Dissertação]: Universidade de São Paulo; 2010.
39. Eide PK, Hole K. The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity. *Cephalalgia : an international journal of headache*. 1993;13(2):75-85.
40. Yaksh TL, Tyce GM. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain research*. 1979;171(1):176-81.
41. Yaksh TL, Wilson PR. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979;208(3):446-53.

42. Cousins MJC, M.L. Physiology and Psychology of Acute Pain. *Acute Pain Management: Scientific Evidence*. 2005:1-19.
43. Peng YB, Lin Q, Willis WD. The role of 5-HT₃ receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276(1):116-24.
44. Nicholson BD. Diagnosis and management of neuropathic pain: a balanced approach to treatment. *J Am Acad Nurse Pract*. 2003;15(12 Suppl):3-9.
45. Pierce PA, Xie GX, Peroutka SJ, Levine JD. Dual effect of the serotonin agonist, sumatriptan, on peripheral neurogenic inflammation. *Reg Anesth*. 1996;21(3):219-25.
46. Ronde P, Nichols RA. High calcium permeability of serotonin 5-HT₃ receptors on presynaptic nerve terminals from rat striatum. *Journal of neurochemistry*. 1998;70(3):1094-103.
47. Nyce HL, Stober ST, Abrams CF, White MM. Mapping spatial relationships between residues in the ligand-binding domain of the 5-HT₃ receptor using a molecular ruler. *Biophys J*. 2010;98(9):1847-55.
48. Lochner M, Lummis SC. Agonists and antagonists bind to an A-A interface in the heteromeric 5-HT_{3AB} receptor. *Biophys J*. 2010;98(8):1494-502.
49. Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene*. 2003;310:101-11.
50. Thompson AJ, Price KL, Reeves DC, Chan SL, Chau PL, Lummis SC. Locating an antagonist in the 5-HT₃ receptor binding site using modeling and radioligand binding. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(21):20476-82.
51. Walstab J, Hammer C, Bonisch H, Rappold G, Niesler B. Naturally occurring variants in the HTR3B gene significantly alter properties of human heteromeric 5-hydroxytryptamine-3A/B receptors. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(9):793-802.
52. Walstab J, Rappold G, Niesler B. 5-HT₃ receptors: role in disease and target of drugs. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):146-69.
53. Kranzler HR, Pierucci-Lagha A, Feinn R, Hernandez-Avila C. Effects of ondansetron in early- versus late-onset alcoholics: a prospective, open-label study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(7):1150-5.

54. Tecott LH, Maricq AV, Julius D. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1430-4.
55. Ali Z, Wu G, Kozlov A, Barasi S. The role of 5HT₃ in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neurosci Lett*. 1996;208(3):203-7.
56. Greenshaw AJ, Silverstone PH. The non-antiemetic uses of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists. *Clinical pharmacology and therapeutic applications*. *Drugs*. 1997;53(1):20-39.
57. Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R. Activation of presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates glutamatergic synaptic inputs to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004;26(8):615-22.
58. Hamon M, Gallissot MC, Menard F, Gozlan H, Bourgoin S, Verge D. 5-HT₃ receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibres in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol*. 1989;164(2):315-22.
59. Sufka KJ, Schomburg FM, Giordano J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992;41(1):53-6.
60. Richardson BP, Engel G, Donatsch P, Stadler PA. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature*. 1985;316(6024):126-31.
61. Glaum SR, Proudfit HK, Anderson EG. 5-HT₃ receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain Res*. 1990;510(1):12-6.
62. Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci*. 1991;11(7):1881-8.
63. Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *The Journal of physiology*. 2006;576(Pt 3):809-22.
64. Loyd DR, Chen PB, Hargreaves KM. Anti-hyperalgesic effects of anti-serotonergic compounds on serotonin- and capsaicin-evoked thermal hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*. 2012;203:207-15.
65. White JP, Cibelli M, Rei Fidalgo A, Paule CC, Noormohamed F, Urban L, et al. Role of transient receptor potential and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2010;112(3):729-41.

66. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994;53:55-63.
67. Schaefer F, Yoon SA, Nouri P, Tsao T, Tummala P, Deng E, et al. Growth hormone-mediated janus associated kinase-signal transducers and activators of transcription signaling in the growth hormone-resistant potassium-deficient rat. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(9):2299-306.
68. Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):989-1003.
69. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2008;118(3):337-51.
70. Reid G. ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? *Pflügers Arch*. 2005;451(1):250-63.
71. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(1):55-68.
72. Moran MM, McAlexander MA, Biro T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):601-20.
73. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.
74. Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, et al. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*. 2000;88(2):205-15.
75. McIntyre P, McLatchie LM, Chambers A, Phillips E, Clarke M, Savidge J, et al. Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British journal of pharmacology*. 2001;132(5):1084-94.
76. Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*. 1999;11(3):946-58.
77. Carlton SM, Coggeshall RE. Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett*. 2001;310(1):53-6.

78. Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *The Journal of comparative neurology*. 2001;436(2):225-35.
79. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular pain*. 2007;3:40.
80. Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther*. 2005;106(2):179-208.
81. Marsh SJ, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience*. 1987;23(1):275-89.
82. Wood PL. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. *Peptides*. 1988;9 Suppl 1:49-55.
83. Perner RJ, Koenig JR, Didomenico S, Gomtsyan A, Schmidt RG, Lee CH, et al. Synthesis and biological evaluation of 5-substituted and 4,5-disubstituted-2-aryl amino oxazole TRPV1 antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(13):4821-9.
84. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*. 1999;51(2):159-212.
85. Pini A, Baranowski R, Lynn B. Long-Term Reduction in the Number of C-Fibre Nociceptors Following Capsaicin Treatment of a Cutaneous Nerve in Adult Rats. *The European journal of neuroscience*. 1990;2(1):89-97.
86. Schicho R, Donnerer J, Liebmann I, Lippe IT. Nociceptive transmitter release in the dorsal spinal cord by capsaicin-sensitive fibers after noxious gastric stimulation. *Brain research*. 2005;1039(1-2):108-15.
87. Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Molecular neurobiology*. 2004;30(2):117-25.
88. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1957;111(4):409-19.
89. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32:77-88.

90. Motta EM, Chichorro JG, Rae GA. Role of ET(A) and ET(B) endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. *Neurosci Lett*. 2009;457(3):146-50.
91. Price KL, Lummis SC. The role of tyrosine residues in the extracellular domain of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(22):23294-301.
92. Hovius R, Tairi AP, Blasey H, Bernard A, Lundstrom K, Vogel H. Characterization of a mouse serotonin 5-HT₃ receptor purified from mammalian cells. *Journal of neurochemistry*. 1998;70(2):824-34.
93. Cole KS. Analogue solution for electrical capacity of membrane-covered cubes in cubic array at high concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(11):4003-6.
94. Snedecor GW, Sokal RR, Rohlf FJ. *Statistical methods Biometry*. W.H. Freeman & Co, editor. New York: Owa State University Press; 1946. p.859 p.
95. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. Co WHF, editor. New York 1981. 859 p.
96. Bezanilla F, Armstrong CM. A low-cost signal averager and data-acquisition device. *The American journal of physiology*. 1977;232(5):C211-5.
97. Diochot S, Loret E, Bruhn T, Beress L, Lazdunski M. APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Mol Pharmacol*. 2003;64(1):59-69.
98. Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *Embo J*. 2004;23(7):1516-25.
99. Malpezzi EL, Freitas JC. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24(12):1245-9.
100. Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 2002;40(2):111-24.
101. de Freitas JC, Sawaya MI. Increase of mammalian intestinal motility by the iminopurine caissarone isolated from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon*. 1990;28(9):1029-37.
102. Thompson AJ, Lummis SC. 5-HT₃ receptors. *Curr Pharm Des*. 2006;12(28):3615-30.

103. Trattnig SM, Harpsoe K, Thygesen SB, Rahr LM, Ahring PK, Balle T, et al. Discovery of a novel allosteric modulator of 5-HT₃ receptors: inhibition and potentiation of Cys-loop receptor signaling through a conserved transmembrane intersubunit site. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(30):25241-54.
104. Jorgensen CG, Frolund B, Kehler J, Jensen AA. Discovery of benzamide analogues as a novel class of 5-HT₃ receptor agonists. *ChemMedChem*. 2011;6(4):725-36.
105. Baxter DF, Kirk M, Garcia AF, Raimondi A, Holmqvist MH, Flint KK, et al. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *Journal of biomolecular screening*. 2002;7(1):79-85.
106. Matsumoto K, Lo MW, Hosoya T, Tashima K, Takayama H, Murayama T, et al. Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Lab Invest*. 2012;92(5):769-82.
107. Sugiyama T, Bielefeldt K, Gebhart GF. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci*. 2004;24(43):9521-30.
108. Loyd DR, Weiss G, Henry MA, Hargreaves KM. Serotonin increases the functional activity of capsaicin-sensitive rat trigeminal nociceptors via peripheral serotonin receptors. *Pain*. 2011;152(10):2267-76.
109. Qin HY, Luo JL, Qi SD, Xu HX, Sung JJ, Bian ZX. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. *European journal of pharmacology*. 2010;647(1-3):75-83.
110. Adams PR, Constanti A, Brown DA, Clark RB. Intracellular Ca²⁺ activates a fast voltage-sensitive K⁺ current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature*. 1982;296(5859):746-9.
111. Lancaster B, Nicoll RA. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol*. 1987;389:187-203.
112. Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, et al. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci*. 2001;21(24):9585-97.
113. Smith FL, Stevens DL. Calcium modulation of morphine analgesia: role of calcium channels and intracellular pool calcium. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272(1):290-9.

114. Adams DJ, Callaghan B, Berecki G. Analgesic conotoxins: block and G protein-coupled receptor modulation of N-type (Ca(V) 2.2) calcium channels. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):486-500.
115. Bowersox SS, Luther R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*. 1998;36(11):1651-8.
116. Szallasi A. Small molecule vanilloid TRPV1 receptor antagonists approaching drug status: can they live up to the expectations? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2006;373(4):273-86.
117. Cheung WS, Calvo RR, Tounge BA, Zhang SP, Stone DR, Brandt MR, et al. Discovery of piperidine carboxamide TRPV1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(16):4569-72.

ANEXO

A - Efeito do BDS 391 sobre o influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina

Para ampliar a caracterização do envolvimento dos canais TRPV1 no efeito antinociceptivo do BDS 391 foram realizado novos ensaios de Imageamento de cálcio intracelular que se baseia no uso de fluóroforo (Fura 2/AM) utilizado cultura celular transfectada (HEK293t) expressando canais TRPV1.

Como observado na figura abaixo, o composto BDS 391 nas concentrações 1,5 nM e 1,5 μ M, per si não induz influxo de Ca^{2+} (Figura 26A). No entanto, o BDS 391 (1,5 nM e 1,5 μ M) foi capaz de inibir o influxo de cálcio induzido pela capsaicina em 67 e 82% respectivamente (Figura 26 B e C) . Estes resultados comprovam que o composto BDS 391 é capaz de interferir na modulação dos canais TRPV1.

Figura 26 : BDS 391 bloqueia o influx de Ca^{2+} induzido pela capsaicina em canais hTRPV1 expressos em células transfectadas. **A** – O BDS 391 per si não é capaz de acarretar influx de Ca^{2+} em células transfectadas com TRPV1. **B** – Variação do influxo de Ca^{2+} induzido pela capsaicina em células HEK 293 transfectadas com hTRPV1. **C** – Variação do influx de Ca^{2+} representado pela media $\pm$ S.E.M. (***, $p < 0.001$);

B - Ensaio de ligação (“FLIRP”) do BDS 391 a canais TRPV1

Para confirmar a possível ação do BDS 391 sobre os canais TRPV1, demonstrada nos experimentos apresentados acima, foram realizados, em colaboração com o grupo do Prof. Peter Reeh da Universidade de Erlagen, Alemanha, novos ensaios de ligação, por meio da técnica FLIRP. Os resultados mostram que o BDS 391, na maior concentração avaliada, foi capaz de deslocar para a direita a curva de concentração-resposta da capsaicina. Estes dados confirmam a hipótese de que o BDS 391 apresenta ação antagonista sobre os canais TRPV1, porém com estes dados não é ainda possível afirmar que o BDS 391 se liga no mesmo sítio de ligação da capsaicina ou em algum sítio alostérico.

Figura 27– Ensaio de ligação (“FLIRP”) do BDS 391 a receptores TRPV1. O BDS 391 (100µM) deslocou a curva concentração-resposta da capsaicina, demonstrando afinidade pelo receptor TRPV1.

C – Efeito do BDS 391 sobre a liberação de CGRP induzida pelo calor em pele de rato sensibilizada pela bradicinina

Por fim, para ampliar o entendimento do mecanismo envolvido no efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391, foi avaliado se o composto purificado da anêmona era capaz de interferir na liberação do peptídeo CGRP induzida pela bradicinina e alta temperatura. Os resultados apresentados na Figura 28, demonstram que há liberação do peptídeo CGRP quando a preparação é estimulada com bradicinina (10 μ M) e alta temperatura (40 °C) e que o BDS 391 inibe parcialmente esta resposta. Em contrapartida, quando a preparação foi feita a partir de tecido obtido de camundongos modificados geneticamente, deficientes para os receptores TRPV1, foi observado que a estimulação com bradicinina (10 μ M) e alta temperatura (40 °C) induzem liberação do peptídeo CGRP, porém em uma concentração significativamente inferior ao experimento controle. Também foi demonstrado que o BDS 391 não interferiu na liberação do CGRP em camundongos deficientes para TRPV1.

Estes dados em conjunto, indicam que canais TRPV1 podem estar envolvidos na ação do BDS 391.

Figura 28 – Efeito do BDS 391 sobre a liberação de CGRP induzida pela Bradicinina e calor - Os valores foram obtidos por meio da incubação por 5 min. Foram utilizados dois tubos controles (32 e 22 °C) e no terceiro tubo foram realizados a estimulação com bradicinina (10 μ M e calor (40 °C) na presença ou ausência do BDS 391 (15 μ M). A pele da pata foi isolada de camundongos C57BL/6 (WT - controle) e camundongos deficientes para TRPV1 (V1ko). (*, $p < 0.05$). (# não significativo) $n = 6$.