

**WILSON ALVES FERREIRA JÚNIOR**

**Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico,  
sobre receptores 5-HT<sub>3</sub> 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

## RESUMO

Ferreira Júnior, WA. Caracterização do efeito do BDS 391, um composto analgésico, sobre receptores 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>. 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>, 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-HT<sub>3</sub>, 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 Ca<sup>2+</sup> em cultura de neurônios do DRG de ratos, a possível ação do BDS 391 sobre correntes iônicas Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>). Nossos resultados evidenciaram que o BDS 391 não interage com os Cavs, porém bloqueia o influxo de Ca<sup>2+</sup> 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-HT<sub>3</sub>.

## ABSTRACT

Ferreira Júnior, WA. Characterization of the effect of BDS 391, an analgesic compound, on 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> receptor antagonist) inhibits the effect of BDS 391, indicating the involvement of 5-HT<sub>3</sub> in the antinociceptive effect of this substance. However, binding studies have shown that BDS 391 does not directly interact with the 5-HT<sub>3</sub> receptor. The possible effect of BDS 391 on TRPV1 ion channels was investigated in vitro, through Ca<sup>2+</sup> imaging studies. Cultured DRG neurons were used for Ca<sup>2+</sup> imaging. BDS 391 inhibited capsaicin-evoked Ca<sup>2+</sup> 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-HT<sub>3</sub> receptors.

**Keyword:** BDS 391. Sea anemone. Pain. TRPV1 channels. 5-HT<sub>3</sub> receptors

# 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 imunossuppressores (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 crispera*, 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<sup>+</sup> de crustáceos (4).

Outra anêmona da costa brasileira que vem sendo estudada é a *Bunodosoma cangicum*, congênera de *B. caissarum*. Araque e colaboradores (18) avaliaram a peçonha deste animal e encontraram atividade inibitória sobre canais de K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>2+</sup>. 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 contém 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.

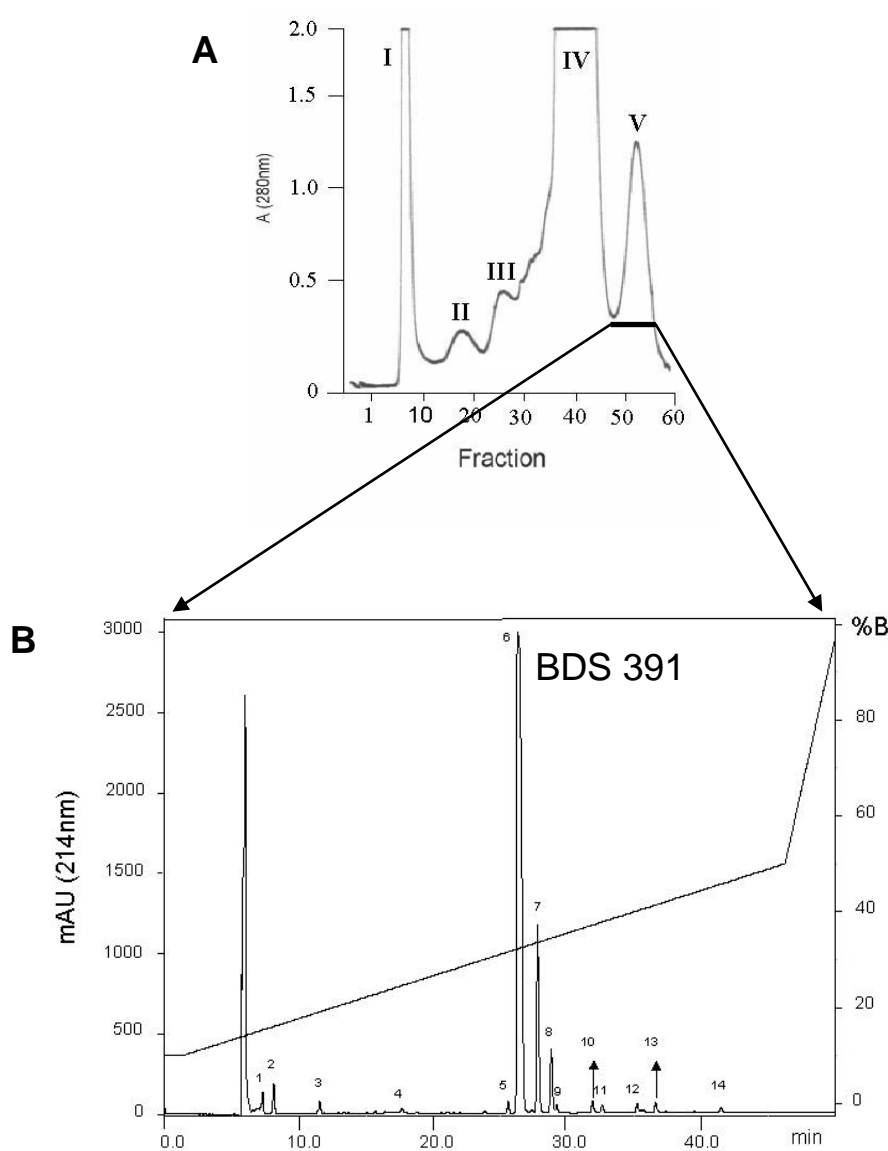
Por apresentar, estruturalmente, um núcleo molecular similar a serotonina, ligado a uma histidina, a possível ação do BDS 391 nas vias de transmissão da dor foi investigada pelo nosso grupo(24). Interessantemente, ensaios comportamentais evidenciaram que o BDS 391 (0,006 - 6 µg/pata), administrado perifericamente 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

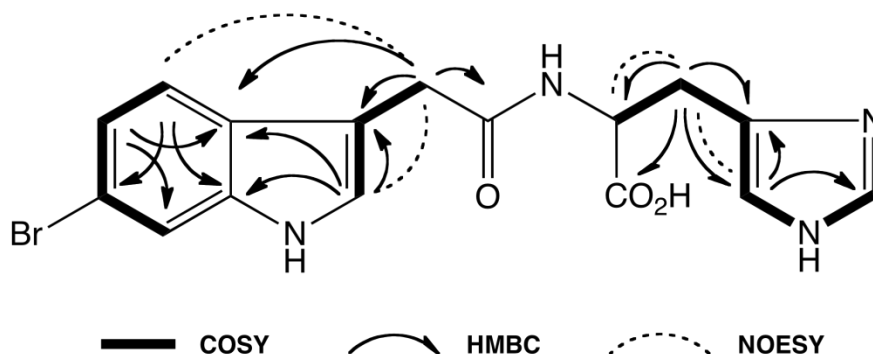
antagonistas seletivos para os receptores 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. Os estudos mostraram que este efeito antinociceptivo é mediado pela ativação de receptores 5HT<sub>3</sub> periféricos (Ferreira Júnior, WA e Cury, Y - manuscrito em fase de elaboração). É importante ressaltar que o subtipo 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>.

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 antagonista seletivo para o receptor 5-HT<sub>3</sub> (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 contínua (% B) representa a variação do gradiente empregada. Empregou-se um gradiente linear de 5 a 55% de solvente B (CH<sub>3</sub>CN / 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 5HT<sub>3</sub>*

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-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, 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<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A-C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> 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-HT<sub>3</sub>, localizado nas terminações nervosas, favorece a abertura de canais iônicos e a passagem de correntes de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, resultando na despolarização da fibra nervosa e na geração de potenciais de ação (46). Como mencionado anteriormente, o receptor 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>, assim como os receptores nicotínicos (AChRs), os receptores para glicina (GlyR) e os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub>R), 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-HT<sub>3</sub> têm cinco subunidades diferentes (5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> (47, 48, 50). Estes estudos têm mostrado que apenas o subtipo homomérico 5-HT<sub>3A</sub> é fisiologicamente funcional. Por outro lado, trabalhos têm evidenciado que canais heteroméricos 5-HT<sub>3A/B</sub> apresentam importante papel fisiológico, uma vez que as diferentes conformações interferem com a seletividade a ions Ca<sup>2+</sup> pelo canal (51).

O receptor 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>. Neste estudo foi observado que esse agonista, induz aumento da responsividade de neurônios da raiz dorsal da medula espinal de ratos a estímulos nocivos, indicando o envolvimento destes receptores na nocicepção (55).

Os receptores 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> nas fibras nervosas aferentes (58) favoreceram o desenvolvimento de estudos objetivando caracterizar o papel fisiológico destes receptores nestes neuronios. Estes estudos têm sugerido a participação do receptor 5-HT<sub>3</sub> em diferentes processos, incluindo as vias de transmissão da dor e seu controle.

Nas fibras nervosas aferentes, a ativação pré-sináptica do receptor 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub>, 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-HT<sub>3</sub> pós-sinápticos, acarreta influxo de íons Na<sup>+</sup>, resultando em rápida despolarização neuronal (46), contribuindo para a nocicepção.

Cabe ressaltar que o efeito acarretado pelos antagonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 A $\delta$ . 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-HT<sub>3</sub>, 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-HT<sub>3</sub>. 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 Ca<sup>2+</sup> intracelular em neurônios sensíveis a capsaicina, torna-se relevante avaliar o efeito do BDS 391 sobre receptores TRPV1.



## 4 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<sup>+</sup> 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](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, Cavalheiro 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-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F 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-HT(2) and 5-HT(3) 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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<sub>3AB</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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 5HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Clinical pharmacology and therapeutic applications. Drugs*. 1997;53(1):20-39.
57. Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R. Activation of presynaptic 5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain Res*. 1990;510(1):12-6.
62. Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL. Spinal 5-HT<sub>3</sub> 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? *Pflugers 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-arylamino 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-hydroxytryptamine<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3</sub> 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. Sugiuar 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 Ca<sup>2+</sup> activates a fast voltage-sensitive K<sup>+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 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 Schmiedebergs 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.