

**Wilson Alves Ferreira Júnior**

**Caracterização da ação molecular da Bunodosina 391,  
composto analgésico obtido da peçonha da anêmona  
*Bunodosoma cangicum***

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Yara Cury

São Paulo  
2010

## RESUMO

Ferreira Junior WA. Caracterização da ação molecular da Bunodosina 391, composto analgésico obtido da peçonha da anêmona *Bunodosoma cangicum*. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Substâncias bioativas obtidas de venenos animais, podem interagir com diversos alvos farmacológicos, o que as tornam ferramentas importantes para o entendimento, por exemplo, dos mecanismos da dor e seu controle. As anêmonas do mar utilizam rico complexo protéico 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. Recentemente, foi demonstrado que a Bunodosina 391 (BDS 391), um composto de baixo peso molecular isolado da peçonha da anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*, acarreta aumento do limiar nociceptivo de ratos, quando avaliada no teste de pressão de patas. A molécula bioativa BDS 391 é um composto bromado de aproximadamente 400 Da, composta de um núcleo molecular semelhante a serotonina (5-HT), conectado, por meio de uma ligação peptídica, a uma histidina. Ensaios farmacológicos iniciais mostraram que a atividade do BDS 391 é mediada pela ativação de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos e pela abertura de canais de potássio. É interessante observar que o BDS 391 apresenta similaridade estrutural a 5-HT e histamina, sendo esta última um derivado do aminoácido histidina, o que torna de especial interesse a detecção do efeito antinociceptivo periférico para este composto. Assim, o presente projeto de pesquisa visou caracterizar a ação antinociceptiva do BDS 391 em modelos de nocicepção manifesta em camundongos e de hipernocicepção aguda e crônica em ratos e também ampliar a caracterização dos mecanismos envolvidos nesta ação, determinando, por meio de ensaios comportamentais, *in vivo* e de ensaios de “binding” e eletrofisiológicos, *in vitro*, os subtipos de receptores serotoninérgicos e de canais de potássio responsáveis pelo efeito antinociceptivo. Os resultados mostraram que o BDS 391 (0.15 - 150  $\mu$ M) foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1%. Também foi observado que o composto BDS 391 apresenta efeito antinociceptivo em modelos de hiperalgesia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub> ou pela constrição crônica do nervo isquiático. Os estudos farmacológicos evidenciaram que a ação do BDS 391 é mediada pela ativação dos receptores para serotonina do subtipo 5-HT<sub>3</sub>. No entanto, resultados preliminares dos ensaios de ligação mostraram que o BDS 391 não é capaz de interferir com a ligação do antagonista seletivo deste receptor. Neste estudo, também foi confirmada, por ensaios de *immunoblotting*, que os subtipos de receptores 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> estão expressos nos tecidos periféricos. Apesar de dados farmacológicos anteriores evidenciarem que a abertura de canais de potássio dependente de voltagem está envolvida na ação antinociceptiva do BDS 391, estudos eletrofisiológicos em ovócitos de *Xenopus laevis* indicaram que este composto não é capaz de atuar diretamente nesses canais. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o melhor entendimento da ação analgésica do BDS 391 e também para a caracterização da importância dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> periféricos para o controle da dor.

**Palavras-chave:** BDS 391. Anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*. Antinocicepção. Receptores Serotoninérgicos.

## ABSTRACT

Ferreira Junior WA. Characterization of the molecular mechanisms involved in the analgesic effect of Bunodosina 391, new compound obtained from *Bunodosoma cangicum* sea anemone venom. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Animal toxins are directed against a wide variety of pharmacological targets, making them an invaluable source of ligands for studying, for example, the signaling pathways of pain and its control. Sea anemone (cnidaria) venoms contain many biologically active compounds such as cytolytins (18–20 kDa) and ion channel modulators (3–5 kDa). In addition, low molecular weight compounds have been isolated and identified in these venoms; however few studies have been carried out in order to determine the biological activity of such compounds. BDS 391 is a low molecular weight (~390 Da) and non-peptidic compound purified from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom. Studies on the structure of BDS 391 have demonstrated that this compound is composed of a bromoindole group connected to histidine. Our recent data have indicated that BDS 391 administered by intraplantar (i.pl.) route into the rat hind paw induces potent peripheral analgesia in the rat paw pressure test. Initial results indicated that peripheral 5-HT receptors and  $K_V$  channels mediate the analgesic action of this compound. The aim of the present work was to further characterize the analgesic action of BDS 391 and its mechanisms, determining its analgesic effect on different models of acute and chronic pain, the type of 5-HT receptor involved in this effect, the presence of these receptors in the inflamed tissue and the ability of BDS 391 to directly activate  $K_V$  channels. BDS 391 (0.15 - 150  $\mu$ M) inhibited the nociceptive response induced by formalin in mice, and the hyperalgesia induced, in rats, by prostaglandin  $E_2$  or by the chronic constriction of sciatic nerve. Pharmacological studies indicated that peripheral 5-HT<sub>3</sub>, but not 5-HT<sub>1a</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors, mediate the action of BDS 391. Results obtained in immunoblotting assays confirmed that 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors are expressed in nerve paw and dorsal root ganglia. Results of binding assays showed that BDS 391 does not displace the radiolabelled antagonist to 5-HT<sub>1a</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub>, indicating that this compound does not directly bind to serotonergic receptors. In voltage clamp studies, BDS 391 was screened in 9 cloned voltage gated potassium channels. BDS 391 did not modify the peak or shape of ionic potassium current, indicating that opening of voltage gated potassium channels induced by BDS 391 does not result from a direct action of the compound on these channels, but could result from the (indirect) activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors, a channel activated by ligand. These results contribute to the better comprehension of the analgesic action of BDS 391 and also points out the role of peripheral 5-HT<sub>3</sub> receptors for pain control.

**Keywords:** BDS 391. *Bunodosoma cangicum* sea anemone. Antinociception. Serotonin Receptors.

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Toxinas de anêmonas do mar*

Os Cnidários são considerados um grupo animal basal e altamente diversificado. O filo Cnidário é formado por anêmonas do mar, corais, águas vivas e hidras. 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 (Turk e Kem, 2009). 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 cnidocistos são ejetados para o meio extracelular, liberando rica gama de substâncias bioativas. Os animais desse grupo empregam suas toxinas tanto para capturar presas quanto para a defesa contra predadores. Embora existam cerca de 30 tipos morfolologicamente distintos de cnidocistos, a maioria dos animais apresenta baixa diversidade destas estruturas (Turk e Kem, 2009).

A grande maioria das espécies descritas de Cnidários é considerada inofensiva quando em contato com a pele humana. Apenas uma pequena fração (<1%) tem sido implicada em acidentes com humanos. No entanto, muitas toxinas vêm sendo isoladas da peçonha destes animais e caracterizadas tanto bioquímica quanto farmacologicamente. Desde a década de 1970, vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de caracterizar os mecanismos envolvidos na ação das toxinas de anêmonas. Estes estudos elucidaram, por exemplo, os mecanismos de ação das toxinas ATX-I, II e III da anêmona *Anemonia sulcata*, habitante do mar Mediterrâneo, mostrando que estas toxinas retardam a inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem (Beress et al., 1975; Norton et al., 1980). Adicionalmente a estas neurotoxinas, foi também mostrada a presença de hemolisinas na peçonha destes animais (Malpezzi e Freitas, 1991; Lagos et al., 2001; Anderluh e Macek, 2002; Oliveira et al., 2004). As hemolisinas são proteínas que formam poros em membranas celulares e causam desequilíbrio osmótico e lise celular (Lanio et al., 2001; Hong et al., 2002).

Com o surgimento, nas décadas de 1970 e 1980, da técnica de “patch-clamp”, a caracterização de peptídeos das mais diversas fontes animais, bem como de sua atividade biológica, teve avanço considerável. Neste sentido, foi possível evidenciar 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 (Kalman et al., 1998) e Kv3.2 (Yan et al., 2005). 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 auto-imunes (Ghanshani et al., 2000; Beeton et al., 2001; Beeton e Chandy, 2005). Neste sentido, foram obtidos, por meio de mutações sítio-dirigidas, análogos da toxina ShK com maior capacidade de bloquear estes canais, podendo favorecer o desenvolvimento de imunossupressores (Beeton et al., 2001).

Recentemente, foi descrita uma nova classe de toxinas peptídicas de anêmonas, cujos representantes principais são as toxinas APETx1 e APETx2 isoladas de extratos da anêmona *Anthopleura elegantissima* (Diochot et al., 2003, 2004). A APTx1 é um peptídeo modulador de canais para potássio do tipo hERG (“Human Ether-a-gogo Related Gene”) e a APTx2, um bloqueador de canais do tipo ASIC (“Acid-sensing Ion Channels”). Da espécie japonesa *Antheopsis maculata*, Honma e Shiomi (Honma e Shiomi, 2005) isolaram outro peptídeo com seqüência primária similar a APETx1 e 2. Das anêmonas encontradas no Brasil, foi isolada e caracterizada, na peçonha da espécie *Bunodosoma caissarum*, espécie endêmica da costa brasileira, a toxina BcIV, que apresenta estrutura primária semelhante a APETx1 e 2. Estudos eletrofisiológicos evidenciaram que a BcIV atua especificamente em correntes de  $Na^+$  de crustáceos (Oliveira et al., 2006). Sugere-se que no futuro próximo, outras toxinas dessa nova categoria sejam isoladas e, conseqüentemente, novos canais iônicos, alvos destas toxinas, poderão ser caracterizados.

Em 1993, foi também isolada da fração neurotóxica da peçonha de *B. caissarum*, um polipeptídeo de 48 resíduos de aminoácidos, denominado BcIII, que pertence às toxinas do tipo 1 de anêmonas do mar (Malpezzi et al., 1993). As toxinas do tipo 1 apresentam posição conservada dos seis resíduos de cisteína, importantes para a determinação estrutural, discriminando canais de  $Na^+$  (Norton, 1991). Estas toxinas se ligam ao sítio 3 destes canais de  $Na^+$ . A BcIII 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 e outras duas toxinas das anêmonas *Anemonia sulcata* (ATXII) e *Anthopleura fuscoviridis* (AFTII) ligam-se a alguma outra região dos canais de sódio, além do sítio 3 (Oliveira et al., 2004). Como consequência deste tipo de ligação, 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 dos mesmos, abrindo a possibilidade de que os peptídeos de anêmonas sejam empregados como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas ou como importantes ferramentas farmacológicas no estudo da biofísica de canais de sódio.

Outra anêmona da costa brasileira que vem sendo estudada é a *Bunodosoma cangicum*, congênera de *B. caissarum*. Araque e colaboradores (Araque et al., 1995) detectaram atividade inibitória da peçonha destes animais, sobre canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ . Posteriormente, Lagos e colaboradores (Lagos et al., 2001) observaram que diferentes frações da peçonha deste animal apresentavam atividade hemolítica e neurotóxica. Estas neurotoxinas atuam sobre canais de sódio dependentes de voltagem, além de inibirem canais de potássio dependentes de voltagem (Wanke et al., 2009; Moran et al., 2009; Zaharenko et al., 2008; Yeung et al., 2005). Foi também isolado e caracterizado, da *B. cangicum*, um novo peptídeo, denominado Cangitoxina (CGTX), contendo 48 resíduos de aminoácidos, claramente pertencente às toxinas do tipo 1 das anêmonas, (Cunha et al., 2005). Posteriormente, Zaharenko e colaboradores (Zaharenko et al., 2008) demonstraram a presença de duas isoformas desta toxina, CGTXII e CGTXIII, que são eluídas juntamente com a Cangitoxina.

Além de neurotoxinas com atividade em canais de sódio e potássio, foi também demonstrada a presença, na peçonha de anêmonas do mar, de toxinas peptídicas com atividade analgésica. Andreev e colaboradores observaram que o APHC1, um polipeptídeo de 56 resíduos de aminoácidos obtido da anêmona *Heteractis crispa*, induz efeito analgésico (Andreev et al., 2008). Este efeito parece estar correlacionado a ação desta toxina em receptores TRPV1, uma vez que estudos *in vitro* mostraram que o composto bloqueia parcialmente as correntes iônicas induzidas, nestes canais, por capsaicina.

Além das neurotoxinas e das hemolisinas, a peçonha das anêmonas contém compostos de baixo peso molecular. Apesar dos avanços no conhecimento sobre a ação das toxinas peptídicas, pouco ainda se conhece sobre a atividade biológica destes compostos de baixo peso molecular.

Garateix e colaboradores (Garateix et al., 1996) observaram que uma fração de baixo peso molecular, eluída no final da cromatografia de gel-filtração (Sephadex G-50) da peçonha da anêmona *Phyllactis flosculifera*, bloqueava receptores glutamatérgicos metabotrópicos em neurônios de gastrópodes. Sabe-se, por exemplo, que o neurotransmissor muscular de crustáceos e insetos é o glutamato. Desta forma, é possível que predadores desses invertebrados tenham desenvolvido, além de toxinas que atuem em canais iônicos, toxinas que possam interferir com receptores glutamatérgicos.

Recentemente foram isolados compostos bromados e de baixo peso molecular da peçonha da anêmona do mar *B. cangicum*. Por meio de filtração em gel, obteve-se uma fração que é eluída no final do cromatograma, denominada de fração V (FrV). Após purificação desta fração em cromatografia líquida de fase reversa de alto desempenho (HPLC), foram obtidos vários compostos de massas moleculares variando entre 300 e 600 Da. A estrutura dessas moléculas é composta de um núcleo estrutural semelhante à serotonina e conectada, por meio de uma ligação peptídica, a um aminoácido. No composto majoritário da fração V, denominado Bunodosina 391 (BDS 391), a ligação peptídica ocorre entre o núcleo molecular serotonina-símile e uma histidina (Zaharenko et al., 2010 - prelo). Apesar da estrutura molecular semelhante à serotonina, foi demonstrado, pela primeira vez, em nosso laboratório, por meio de ensaios farmacológicos, que o composto BDS 391, administrado por via intraplantar em ratos, aumenta o limiar nociceptivo destes animais, no teste de pressão de patas (modelo de nocicepção mecânica). Estudos farmacológicos mostraram que este efeito é mediado pela ativação de receptores para serotonina e histamina, mas não por receptores opióides. Foi demonstrado também, o envolvimento de canais de potássio dependentes de voltagem nesse efeito antinociceptivo (Ferreira Júnior WA e Cury Y, 2010 – em fase de elaboração)<sup>1</sup>. Em relação aos receptores 5-HT, foi evidenciado, neste mesmo teste, que antagonistas seletivos para o receptor do subtipo 5-HT<sub>3</sub>, mas não 5-HT<sub>1a</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, revertiam este efeito, indicando o envolvimento destes receptores na ação do BDS 391. 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 (Faerber et al., 2007). 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>. Ainda, apesar de acarretar aumento no limiar nociceptivo dos animais, não foi, até o momento, avaliada a capacidade do BDS 391 em interferir com a nocicepção manifesta ou em modelos de hipernocicepção aguda e crônica.

Os resultados mostrando o envolvimento de receptores 5-HT<sub>3</sub> e de receptores histaminérgicos no aumento do limiar nociceptivo induzido pelo BDS 391, são intrigantes, uma vez que vários dados de literatura têm evidenciado que a administração periférica de histamina ou serotonina (5-HT), ao contrário do observado no SNC, acarreta efeitos nociceptivos (Giordano e Gerstmann, 2004; Taiwo e Levine, 1992; Giordano e Rogers, 1989). Contudo, efeitos controversos destas aminas, na modulação da dor, têm sido relatados (Kesim et al., 2005; Zeitz et al., 2002; Sommer, 2006).

Dados de literatura têm sugerido que a 5-HT, por meio da ação em diferentes subtipos de receptores, particularmente receptores 5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub> e 5HT<sub>3</sub>, pode induzir dor ou analgesia. Estes dados tem mostrado que no SNC, a serotonina é um importante inibidor da transmissão da informação nociceptiva (Bardin et al., 1997, 2000), contudo, na periferia, várias evidencias experimentais têm indicado que a administração ou liberação de serotonina pode evocar dor ou analgesia (Zeitz et al., 2002; Mueller e Quock, 1992; Doak e Sawynok, 1997; Tokunaga et al., 1998; Sommer, 2004). Da mesma forma, a histamina tem sido apontada como importante modulador da transmissão da dor, sendo, porém, esta ação dependente do sítio de sua administração ou liberação, da dose administrada e do receptor envolvido (receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>) (Malmberg e Yaksh, 1994; Brown et al., 2001; Farzin et al., 2002; Raffa, 2001). Contudo, está bem estabelecido que periféricamente, esta amina apresenta efeito hipernociceptivo (Raffa, 2001; Malmberg e Basbaum, 1998).

Baseados nos dados obtidos pelo nosso grupo, mostrando que receptores histaminérgicos e serotoninérgicos estão envolvidos na alteração do limiar nociceptivo periférico induzido pelo BDS 391 e em dados da literatura que mostram o envolvimento destes receptores tanto na dor quanto na analgesia, torna-se relevante a ampliação dos estudos sobre os mecanismos envolvidos na ação do BDS 391, com o intuito de melhor entender a participação de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos neste efeito e para a caracterização do tipo de interação da molécula com estes receptores, bem como avaliar a sua capacidade em acarretar analgesia em



modelos de nocicepção manifesta, aguda ou persistente.

## ***1.2 Dor – Considerações Gerais***

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias, as quais possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos, denominadas nociceptores (receptores da dor). Os nociceptores são terminações nervosas livres sendo uma continuação da própria fibra nervosa sensitiva. Os nociceptores ou fibras aferentes nociceptivas primárias são normalmente ativados por estímulos de alta intensidade. Estes estímulos podem ser de origem mecânica, térmica e/ou química.

Os neurônios aferentes primários desempenham três funções principais no que diz respeito à nocicepção: 1- detecção do estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução); 2- condução do impulso da periferia para a medula espinhal; 3- transferência desses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (Caviedes e Herranz, 2002; Basbaum et al., 2009; Vanderah, 2007). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (Basbaum et al., 2009; Vanderah, 2007; Schaible e Richter, 2004; Wootton, 2004).

Muitas fibras aferentes nociceptivas são desprovidas de mielina e, portanto possuem baixa velocidade de condução. Estas fibras são denominadas fibras C e são também caracterizadas como nociceptores polimodais, uma vez que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas A $\delta$ , conduzem mais rapidamente os estímulos periféricos. As fibras nociceptivas terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, formando conexões sinápticas com os neurônios secundários que se dirigem ao tálamo (Basbaum et al., 2009; Belmonte e Cervero, 1996; Julius e Basbaum, 2001; Rangb et al., 1997). Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, fibras nociceptivas, particularmente as do tipo C, são sensibilizadas e, conseqüentemente, podem ser ativadas por estímulos de menor intensidade, acarretando hipernocicepção (aumento da resposta a estímulos nocivos) ou alodinia (resposta a estímulos não nocivos) (Kidd e Urban, 2001; Dworkin et al.,

2003), considerados os mais importantes fenômenos nociceptivos de um processo inflamatório. Cabe ressaltar que os termos hipernocicepção e alodinia são usualmente empregados para descrever sensação de dor em humanos. Assim, alguns trabalhos têm empregado o termo “hipernocicepção” para descrever o fenômeno de hiperalgesia em animais (Farzin et al., 2002; Loeser e Treede, 2008; Malmberg-Aiello et al., 1998; Parada et al., 2003). É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores "silenciosos" ou "adormecidos" (silent/sleeping nociceptors), são ativados durante processos inflamatórios, contribuindo para a hipernocicepção. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (Schaeffer et al., 1988; Schemelz et al., 1994).

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, tais como prótons extracelulares, mediadores lipídicos, incluindo prostaglandinas, além de citocinas, bradicinina, histamina, serotonina, entre outros, podem interferir com a atividade dos neurônios nociceptivos primários (Basbaum et al., 2009; Schaible e Richter, 2004; Julius e Basbaum, 2001). Os mediadores periféricos da hipernocicepção atuam via receptores ligados a intermediários celulares regulatórios (proteína G, segundos mensageiros), que regulam a permeabilidade da membrana e a concentração iônica celular (Pan et al., 2008; Bevan, 1999; Reichling e Levine, 1999). A sensibilização dos neurônios nociceptivos primários é decorrente, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínquinases, como PKA, acarretando a fosforilação de canais iônicos e o aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular. A consequência destes efeitos metabólicos é a despolarização parcial da membrana neuronal facilitando a geração e a transmissão de impulsos nervosos (Cunha et al., 1999; Ferreira, 1994; England et al., 1996). Alguns mediadores hipernociceptivos elevam diretamente as concentrações intracelulares de AMPc, enquanto outros, cujos receptores não estão acoplados a adenilato ciclase, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação da proteínquinase C (PKC) (Bevan, 1999). A ativação da PKC acarreta a fosforilação e o aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a  $Ca^{2+}$  e  $Na^{+}$  (Basbaum et al., 2009; Julius e Basbaum, 2001; Millan, 1999; Lorenzetti e Ferreira, 1996). Tem sido proposto ainda que a via das proteínquinases ativadas por mitógeno (MAPquinases/MAPKs), que se inicia pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina, pode ser ativada independentemente da presença da PKC ou PKA (Dina et al., 2003).

Esta via de sinalização é composta por 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK (Ji e Woolf, 2001; Ramam et al., 2007). Dados da literatura têm mostrado a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hipernociceptivos (Ramam et al., 2007; Daí et al., 2002; Obata e Noguchi, 2004; Daulhac et al., 2006). Independentemente do mecanismo de sinalização intracelular, o aumento na expressão e fosforilação de canais iônicos em membranas de neurônios periféricos é o principal fator responsável pelo aumento da excitabilidade da membrana destas células (Woolf, 2000). Os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos são os canais de sódio e de cálcio dependentes de voltagem (Woolf, 2004; Vanegas e Schaible, 2000; Saegusa et al., 2002). Além dos canais de sódio e cálcio, canais de potássio dependentes de voltagem têm papel relevante no controle da dor. A perda da função dos canais de potássio envolvidos na determinação do limiar de potencial de ação ou na repolarização da membrana celular, pode alterar a excitabilidade dos neurônios ocasionando aumento da sensibilidade a estímulos nocivos e/ou diminuindo a suscetibilidade a analgésicos. Desta maneira, os canais para potássio dependente de voltagem (Kv) se tornaram um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversas doenças, incluindo síndromes dolorosas (Wulff et al., 2009). Além disso, várias evidências experimentais tem sugerido o envolvimento de canais de potássio sensíveis a ATP na ação analgésica de diversos fármacos, incluindo os opióides (Khanna et al., 2010; Lohmann e Welch, 1999).

Além da sensibilização dos neurônios nociceptivos primários, outros mecanismos podem estar envolvidos na gênese da hipernocicepção e alodinia, como excitabilidade ectópica, aumento da excitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal ou no núcleo trigeminal do tronco cerebral (Sensibilização Central), reorganização estrutural e redução da atividade de sistemas inibitórios endógenos (Woolf, 2004; Costigan e Woolf, 2000).

O corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação da informação nociceptiva da periferia para o SNC (Aimone e Yaksh, 1989; Yaksh, 1999). O principal neurotransmissor excitatório envolvido na sensação nociceptiva é o glutamato, enquanto neuropeptídeos como a substância P, a neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) parecem atuar como neuromoduladores da transmissão nociceptiva (Schaible e Richter, 2004; Kidd e Urban, 2001). Estes neuromoduladores agem em receptores específicos na membrana pós-sináptica, favorecendo a transmissão da informação nociceptiva. A

ativação e a modulação dos receptores NMDA para glutamato têm papel importante na indução e manutenção da sensibilização dos neurônios medulares (Sensibilização Central) (Schaible e Richter, 2004). Contudo, a liberação de neuropeptídeos, de fatores neurotróficos e de prostaglandinas, neste sítio medular, também contribui para a gênese do processo de Sensibilização Central (Schaible e Richter, 2004; Woolf, 2000; Besson, 1999). Dados de literatura têm evidenciado ainda, que as células da glia (astrócitos e microglia) presentes na medula espinhal, por meio da liberação ou captação de vários mediadores nociceptivos, contribuem também para a Sensibilização Central (Wieseler-Frank et al., 2004; Ren e Dubner, 2008; Smith, 2010).

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 (Cousins, 2005). Os múltiplos tratos descendentes inibitórios se originam de núcleos presentes no tronco cerebral. Neurotransmissores como acetilcolina, GABA, glicina e opióides modulam a atividade destes tratos descendentes inibitórios (Millan, 2002). A nocicepção é, portanto, um processo gerado na periferia e modulado no SNC. Alterações no controle descendente da nocicepção também podem provocar sensibilização central e, conseqüentemente, estados hipernociceptivos.

### ***1.3 Aminas biogênicas no processo de geração e modulação da dor***

#### **1.3.1 Serotonina (5-HT)**

A serotonina (5-HT) está envolvida nos processos de dor e seu controle, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (SNC) (Eide e Hole, 1993).

Vários dados experimentais têm mostrado que a liberação de 5-HT, no SNC, induz efeito analgésico (Yaksh e Tyce, 1979; Yaksh e Wilson, 1979). 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 (Peng et al., 1996). 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 (Liu et al., 1988; Lin et al., 1996).

Nos tecidos periféricos, diferentemente da ação no SNC, a serotonina é considerada um mediador inflamatório pró-nociceptivo (Nicholson, 2003). 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 outra lesão tecidual periférica (Sommer, 2006). A ação biológica da serotonina, liberada após injúria tecidual, depende dos subtipos de receptores presentes nos neurônios aferentes primários, que são ativados por ela. 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 (Nicholson, 2003; Pierce et al., 1996; Fozard, 1984). 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, ainda não está totalmente elucidado.

Periféricamente, a serotonina é tanto um ativador direto da transdução como um sensibilizador para outros agentes transdutórios. A serotonina, liberada durante injúria periférica, pode ligar-se a receptores 5-HT<sub>3</sub>, localizados nas terminações nervosas, favorecendo a abertura de canais iônicos e a passagem de correntes de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup>, resultando na despolarização de fibras nervosas e geração de potenciais de ação. É importante salientar que 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 (Faerber et al., 2007). A serotonina também se liga aos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, presentes em fibras nervosas aferentes primárias, iniciando o processo de sensibilização, via proteína G e processos dependentes da ação da fosfolipase C (Ness, 2001).

### 1.3.2 Histamina

A histamina tem papel importante na percepção da dor e modulação dos processos nociceptivos (Suzuki et al., 1994; Cannon e Hough, 2005). No SNC, os neurônios histaminérgicos se originam a partir de núcleos tuberomamílares, localizados no hipotálamo

posterior. Estes núcleos recebem informações vindas principalmente do sistema límbico. Os neurônios histaminérgicos, originados a partir do hipotálamo e presentes na substância cinzenta periaquedutal, são considerados como importantes moduladores da dor (Hough et al., 1988). O aumento na concentração de histamina no SNC acarreta efeito antinociceptivo em diversos modelos de avaliação da sensibilidade dolorosa (Malmberg et al., 1994; Netti et al., 1994). O efeito da histamina no SNC é mediado pela ativação de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> (Cannon e Hough, 2005; Passani et al., 2000). Os subtipos de receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> para histamina estão envolvidos no efeito da histamina nas vias nociceptivas (Hough et al., 1999; Galeotti et al., 2004). Tem sido evidenciada, também, a interação entre a histamina e drogas opióides, no SNC, contudo estes dados são ainda controversos. Estudos experimentais têm mostrado que o efeito antinociceptivo induzido pela morfina é aumentado em camundongos “knockout” para receptores H<sub>1</sub> (Mobarakeh et al., 2002), sugerindo que receptores histaminérgicos interferem com o efeito analgésico de drogas opióides. Por outro lado, dados de literatura têm evidenciado que a administração de morfina induz a liberação de histamina na substância cinzenta periaquedutal (Barke e Hough, 1994). Adicionalmente, foi observado que a administração subcutânea de zolantidine, um antagonista de receptor H<sub>2</sub>, inibe parcialmente o efeito antinociceptivo da morfina nos modelos de “tail-flick” e “hot-plate” em ratos, indicando que estes receptores são importantes para a ação do opióide (Gogas et al., 1989).

Apesar da caracterização do papel modulador da histamina no processo de transmissão de dor no SNC, os estudos mostrando o envolvimento de receptores histaminérgicos na nocicepção, na periferia são, ainda, escassos. Embora a presença de receptores H<sub>3</sub> para histamina em neurônios centrais já tenha sido evidenciada (Sander et al., 2008; Arrang et al., 1983; Panula et al., 1984), apenas em 2007, Cannon et al. (2007) demonstraram, por meio de estudos imunoquímicos, que o receptor H<sub>3</sub> também está presente em fibras sensitivas e em neurônios do gânglio da raiz dorsal. A ativação de receptores H<sub>3</sub> reduz a liberação de mediadores inflamatórios peptidérgicos (Ohkubo e Shibata, 1995; Ohkubo et al., 1995), além de interferir com a inflamação e dor de origem inflamatória (Cannon e Hough, 2005; Poveda et al., 2006). A demonstração de que receptores H<sub>3</sub> são importantes moduladores da nocicepção, torna estes receptores alvos terapêuticos importantes para o controle da dor.

#### ***1.4 Controle periférico da dor***

O desenvolvimento de novos fármacos analgésicos tem objetivado a busca por fármacos desprovidos de efeitos adversos no SNC e/ou que tenham preferencialmente ação periférica, ou ainda, que possuam alta especificidade por alvos moleculares envolvidos na dor, diminuindo assim, os efeitos adversos dessas drogas. Estes estudos, além de favorecer a obtenção de novos fármacos analgésicos, têm contribuído para ampliar o conhecimento dos mecanismos periféricos envolvidos na dor, bem como na sua modulação, ainda na fibra nervosa aferente primária. É importante salientar que os estudos visando o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos têm mostrado que toxinas isoladas de venenos animais, em decorrência de sua seletividade e especificidade por canais iônicos, enzimas e componentes de membranas neuronais (receptores metabotrópicos e ionotrópicos) envolvidos no processo de transmissão da dor e de seu controle, apresentam potencial como agentes terapêuticos para o tratamento da dor (Cury e Picolo, 2006; Cury e Picolo, 2009a, 2009b).

Analgésicos, de maneira geral, atuam prevenindo a sensibilização dos nociceptores (Ferreira, 1972; Ferreira et al., 1973), como os antiinflamatórios não esteroidais, ou interferindo, direta ou indiretamente, com os receptores da dor já sensibilizados, como, por exemplo, a dipirona, os opióides ou substâncias liberadoras de opióides endógenos e o óxido nítrico (Ferreira, 1994; Ferreira et al., 1988; Ferreira e Lorenzetti, 1995).

Vários estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ação periférica dos fármacos que agem interferindo com os receptores da dor já sensibilizados, têm mostrado a existência de uma via única comum para a ação de alguns destes fármacos. Estes trabalhos têm evidenciado que opióides, substâncias doadoras de óxido nítrico ou mesmo antiinflamatórios não esteroidais, como o ketorolac promovem analgesia via ativação da via óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais para potássio (Lorenzetti e Ferreira, 1996; Ferreira e Lorenzetti, 1995; Duarte et al., 1992; Ferreira et al., 1991; Rodrigues e Duarte, 2000; Lázaro-Ibáñez et al., 2001; Alves et al., 2004; Sachs et al., 2004). Desta forma, os canais de potássio têm sido considerados como um dos mediadores finais da ação analgésica periférica destes fármacos. Estes canais têm sido caracterizados como canais de potássio sensíveis a ATP, ativados por cálcio ou dependentes de voltagem. (Santos et al., 1999; Galeotti et al., 1999; Ortiz et al., 2002).

Como mencionado anteriormente, foi evidenciado que o BDS 391, composto majoritário da fração V isolada da peçonha da anêmona do mar *B. cangicum* acarreta alteração no limiar nociceptivo basal dos ratos, efeito este mediado pela ativação de receptores 5-HT. Dados preliminares indicam ainda a possível participação de receptores histaminérgicos nesse efeito antinociceptivo. Contudo não está bem caracterizado o tipo de receptor serotoninérgico e histaminérgico envolvido neste efeito. Ainda, como apontado pelos dados da literatura, o envolvimento de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos em processos nociceptivos, favorecendo ou inibindo o seu desenvolvimento, é ainda bastante controverso. Assim, a ampliação dos estudos sobre a caracterização do efeito antinociceptivo periférico induzido pelo BDS 391, por meio de análises mais específicas da interação do BDS 391 com os subtipos de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos, poderão contribuir para o melhor conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no efeito deste composto, bem como do papel periférico da histamina e serotonina nas vias de transmissão de dor e de seu controle.



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que:

- ❖ o BDS 391 induz efeito antinociceptivo, quando administrado via i.pl., nos modelos de nocicepção manifesta e hipernocicepção aguda e persistente;
- ❖ o efeito antinociceptivo induzido pelo BDS 391 é mediado pela ativação de receptores 5-HT<sub>3</sub> para serotonina periféricos.
- ❖ a ação do BDS 391 não é decorrente de interação direta do BDS 391 com o sitio de ligação do antagonista específico para 5-HT<sub>3</sub>;
- ❖ a ação analgésica induzida pelo BDS 391 envolve abertura de canais para potássio dependente de voltagem, no entanto o composto não interfere diretamente com a corrente iônica desses canais.

**REFERÊNCIAS \***

Adam KR, Weiss C. Distribution of 5-hydroxytryptamine in scorpion venoms. *Nature*. 1959 May 16;183(4672):1398-9.

Aimone LD, Yaksh TL. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. *Peptides*. 1989 Nov-Dec;10(6):1127-31.

Alves DP, Soares AC, Francischi JN, Castro MS, Perez AC, Duarte ID. Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and sodium nitroprusside and dibutyl-*c*-GMP. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr 5;489(1-2):59-65.

Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 2002 Feb;40(2):111-24.

Andreev YA, Kozlov SA, Koshelev SG, Ivanova EA, Monastyrnaya MM, Kozlovskaya EP, Grishin EV. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):23914-21.

Araque A, Urbano FJ, Cervenansky C, Gandia L, Buno W. Selective block of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> current in crayfish neuromuscular system and chromaffin cells by sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom. *J Neurosci Res*. 1995 Nov 1;42(4):539-46.

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptor. *Nature*. 1983 Apr 28;302(5911):832-7.

Bardin L, Bardin M, Lavarenne J, Eschalier A. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp Brain Res*. 1997 Jan;113(1):81-7.

Bardin L, Schmidt J, Alloui A, Eschalier A. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. *Eur J Pharmacol*. 2000 Dec 1;409(1):37-43.

Barke KE, Hough LB. Characterization of basal and morphine-induced histamine release in the rat periaqueductal gray. *J Neurochem*. 1994 Jul;63(1):238-44.

---

\*De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84.

Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, Sabatier JM, Bernard D, Crest M, Beraud E. Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):936-44.

Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E. Selective blockade of T lymphocyte K<sup>(+)</sup> channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13942-7.

Beeton C, Chandy KG. Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *Neuroscientist*. 2005 Dec;11(6):550-62.

Belmonte C, Cervero E. *Neurobiology of receptors*. Oxford University Press: Oxford New York Tokyo; 1996.

Bennett GJ, Xie YK. Extraterritorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain*. 1988; 50: 355-63.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988 Apr;33(1):87-107.

Bennett G. An animal model of neuropathic pain: a review. *Muscle & Nerve*. 1993;16:1040-8.

Beress L, Beress R, Wunderer G. Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. *FEBS Lett*. 1975 Feb 15;50(3):311-4.

Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet*. 1999 May 8;353(9164):1610-5.

Bevan S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Text Book of Pain*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1999. p. 85-103.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol.* 2001 Apr;63(6):637-72.

Cannon KE, Hough LB. Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H3 receptors. *J Pain.* 2005 Mar;6(3):193-200.

Cannon KE, Leurs R, Hough LB. Activation of peripheral and spinal histamine H3 receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Nov;88(1):122-9.

Caviedes BE, Herranz JL. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. *Rev Neurol.* 2002 Dec 1-15;35(11):1037-48.

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.

Chen JJ, Vasko MR, Wu X, Staeva TP, Baez M, Zgombick JM, Nelson DL. Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Dec;287(3):1119-27.

Collins SL, Moore RA, McQuayHj, Wiffen P. Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *J Pain Symptom Manage.* 2000 Dec;20(6):449-58.

Corrêa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacology.* 1993;110:193-98.

Costigan M, Woolf CJ. Pain: molecular mechanisms. *J Pain.* 2000 Sep;1(3 Suppl):35-44.

Cousins MJC, M.L. Physiology and Psychology of Acute Pain. *Acute Pain Management: Scientific Evidence.* 2005:1-19.

Cunha FQ, Teixeira MM, Ferreira SH. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1999 Jun;127(3):671-8.

Cunha RB, Santana AN, Amaral PC, Carvalho MD, Carvalho DM, Cavalheiro EA, Maigret B, Ricart CA, Cardi BA, Sousa MV, Carvalho KM. Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon.* 2005 Feb;45(2):207-17.

Cury Y, Picolo G. Animal toxins as analgesics--an overview. *Drug News Perspect.* 2006 Sep;19(7):381-92.

Cury Y, Picolo G. Are animal toxins good models for analgesics?. In: Maria Elena de Lima, Adriano Monteiro de Castro Pimenta, Marie France Martin-Eauclaire, Russolina Benedeta Zingali e Hervé Rochat. (Org.). *Animal Toxins: State of the Art Perspectives in Health And Biotechnology.* 1 ed. Minas Gerais: Editora UFMG, 2009, v. 1, p. 661-678.

Cury Y, Picolo G. Venenos Animais, dor e analgesia. In: João Luiz Costa Cardoso; Francisco Oscar de Siqueira França; Fan Hui Wen; Ceila Maria Sant'Ana Málaque; Vidal Hadda Jr. (Org.). *Animais Peçonhentos no Barsil.* 2 ed. Sao Paulo: Sarvier, 2009, v. , p. 406-416.

Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7737-45.

Daulhac L, Mallet C, Courteix C, Etienne M, Duroux E, Privat AM, Eschalier A, Fialip J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol.* 2006 Oct;70(4):1246-54.

Dina OA, McCarter GC, de Coupade C, Levine JD. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. *Neuron.* 2003 Aug 14;39(4):613-24.

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 Jul;64(1):59-69.

Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory

neurons. *Embo J*. 2004 Apr 7;23(7):1516-25.

Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*. 1997 Oct;80(3):939-49.

Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*. 1995;75:125-31.

Duarte ID, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*. 1992 Jul 7;217(2-3):225-7.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977 Dec;4(2):161-74.

Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 2003 Nov;60(11):1524-34.

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*. 1993 Apr;13(2):75-85.

England S, Bevan S, Docherty RJ. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol*. 1996 Sep 1;495 (Pt 2):429-40.

Evans AR, Vasko MR, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J Physiol*. 1999 Apr 1;516 (Pt 1):163-78.

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. *Eur J Pharmacol*. 2007 Mar 29;560(1):1-8.

Farzin D, Asghari L, Nowrouzi M. Rodent antinociception following acute treatment with different histamine receptor agonists and antagonists. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Jun;72(3):751-60.

Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biol.* 1972;240:200-3.

Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. The blockade of the local generation of prostaglandins explains the analgesic action of aspirin. *Agents Actions.* 1973 Dec;3(5):385.

Ferreira SH, Nakamura MI. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins.* 1979 Aug;18(2):179-90.

Ferreira SH, Lorenzetti BB. Prostaglandin hyperalgesia, IV: a metabolic process. *Prostaglandins.* 1981 May;21(5):789-92.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature.* 1988;334(6184):698-700.

Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 1991 Aug 16;201(1):121-2.

Ferreira SH. Analgesia Con Oxido Nitrico Y Analgesicos. In: Berrazueta, J.R.. (Org.). Oxido nítrico endógeno y fármacos nitrovasodilatadores. Cantabria: Santander: Servicio de publicaciones de la Universidad de Cantabria, 1994, v. , p. 149-162.

Ferreira SH, Lorenzetti BB. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 1994 Nov;33(11):1479-85.

Ferreira SH, Lorenzetti BB. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 1995;33:1479.

Fozard JR. Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology.* 1984 Dec;23(12B):1473-86.

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.

Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R. Activation of presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors facilitates glutamatergic synaptic input to area postrema neurons in rat brain slices. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2004; 26, 615–622.

Fundytus ME, Yashpal K, Chabot JG, Osborne MG, Lefebvre CD, Dray A, Henry JL, Coderre TJ. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br J Pharmacol.* 2001 Jan;132(1):354-67.

Galeotti N, Ghelardini C, Vinci MC, Bartolini A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 1999 Mar;126(5):1214-20.

Galeotti N, Malmberg-Aiello P, Bartolini A, Schunack W, Ghelardini C. H<sub>1</sub>-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology.* 2004 Aug;47(2):295-303.

Garateix A, Flores A, Garcia-Andrade JM, Palmero A, Aneiros A, Vega R, Soto E. Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculifera*. *Toxicon.* 1996 Apr;34(4):443-50.

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. Up-regulation of the IKCa<sub>1</sub> potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):37137-49.

Giordano J, Rogers LV. Peripherally administered serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 1989 Oct 24;170(1-2):83-6.

Giordano J, Gerstmann H. Patterns of serotonin- and 2-methylserotonin-induced pain may reflect 5-HT<sub>3</sub> receptor sensitization. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan 12;483(2-3):267-9.

Gogas KR, Hough LB, Eberle NB, Lyon RA, Glick SD, Ward SJ, Young RC, Parsons ME. A role for histamine and H<sub>2</sub>-receptors in opioid antinociception. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989 Aug;250(2):476-84.

Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1108-12.



Greenshaw AJ, Silverstone PH. The non-antiemetic uses of serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Drugs*, 1997 53, 20–39.

Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience*. 1993 Jul;55(1):185-95.

Hong Y, Ohishi K, Inoue N, Kang JY, Shime H, Horiguchi Y, van der Goot FG, Sugimoto N, Kinoshita T. Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not *Clostridium septicum* alpha-toxin. *Embo J*. 2002 Oct 1;21(19):5047-56.

Honma T, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. Molecular cloning of an epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Dec 1;1652(2):103-6.

Honma T, Hasegawa Y, Ishida M, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. *Toxicon*. 2005 Jan;45(1):33-41.

Honma T, Shiomi K. Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. *Mar Biotechnol (NY)*. 2006 (8):1-10.

Honma T, Minagawa S, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Novel peptide toxins from acrorhagi, aggressive organs of the sea anemone *Actinia equina*. *Toxicon*. 2005 Dec 1;46(7):768-74.

Hough LB, Jackowski S, Eberle N, Gogas KR, Camarota NA, Cue D. Actions of the brain-penetrating H<sub>2</sub>-antagonist zolantidine on histamine dynamics and metabolism in rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1988 Dec 15;37(24):4707-11.

Hough LB, Nalwalk JW, Leurs R, Menge WM, Timmerman H. Antinociceptive activity of impentamine, a histamine congener, after CNS administration. *Life Sci*. 1999;64(5):PL79-86.

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. *J Neurochem*. 1998 Feb;70(2):824-34.

Hu WP, Guan BC, Ru LQ, Chen JG, Li ZW. Potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor function by the activation of coexistent 5-HT<sub>2</sub> receptors in trigeminal ganglion neurons of rats. *Neuropharmacology*. 2004 Nov;47(6):833-40.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987 Jul;30(1):103-14.

Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res*. 2001 Dec;41(4):299-332.

Jaques R, Schachter M. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent, slow contracting substance in wasp venom. *Br J Pharmacol Chemother*. 1954 Mar;9(1):53-8.

Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hokfelt T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*. 1995 Dec;15(12):8156-66.

Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*. 2001 Feb;8(1):1-10.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):203-10.

Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32697-707.

Kassuya CA, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. Intraplantar PGE<sub>2</sub> causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol*. 2007 Mar;150(6):727-37.

Kesim M, Duman EN, Kadioglu M, Yaris E, Kalyoncu NI, Erciyes N. The different roles of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. *J Pharmacol Sci*. 2005 Jan;97(1):61-6.

Khanna N, Malhotra RS, Mehta AK, Garg GR, Halder S, Sharma KK. Interaction of morphine and potassium channel openers on experimental models of pain in mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010. In press.

Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001 Jul;87(1):3-11.

Kooyman AR, Zwart R, Vijverberg HP. Tetraethylammonium ions block 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated ion current at the agonist recognition site and prevent desensitization in cultured mouse neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol*. 1993 Aug 15;246(3):247-54.

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 Jul;34(7):895-902.

Lanio ME, Morera V, Alvarez C, Tejuca M, Gomez T, Pazos F, Besada V, Martinez D, Huerta V, Padron G, de los Angeles Chavez M. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 2001 Feb-Mar;39(2-3):187-94.

Lázaro-Ibáñez G, Torres-López J, Granados-Soto V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur J Pharmacol*. 2001;426:39-44.

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 Mar;276(3):958-67.

Liu MY, Su CF, Lin MT. The antinociceptive role of a bulbospinal serotonergic pathway in the rat brain. *Pain*. 1988 Apr;33(1):123-9.

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 Apr 21;98(8):1494-502.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):473-7.

Lohmann AB, Welch SP. ATP-gated K(+) channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. *Eur J Pharmacol*. 1999 Dec 3;385(2-3):119-27.

Lorenzetti BB, Ferreira SH. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res*. 1996 Jun;45(6):308-11.

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.

Malpezzi EL, de Freitas JC, Muramoto K, Kamiya H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. 1993 Jul;31(7):853-64.

Malmberg AB, Yaksh TL. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J Neurosci*. 1994 Aug;14(8):4882-90.

Malmberg LP, Sorva R, Sovijarvi AR. Frequency distribution of breath sounds as an indicator of bronchoconstriction during histamine challenge test in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol*. 1994 Sep;18(3):170-7.

Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998;76:215-22.

Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ipponi A, Bartolini A, Schunack W. Evidence for hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci*. 1998;63(6):463-76.

Meller ST, Lewis SJ, Brody MJ, Gebhart GF. The Peripheral Nociceptive Actions of Intravenously Administered 5-Ht in the Rat Requires Dual Activation of Both 5-Ht2 and 5-Ht3 Receptor Subtypes. *Brain Research*. 1991 Oct 4;561(1):61-8.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999 Jan;57(1):1-164.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002 Apr;66(6):355-474.

Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res.* 2000 Apr 7;861(1):105-16.

Mobarakeh JI, Sakurada S, Hayashi T, Orito T, Okuyama K, Sakurada T, Kuramasu A, Watanabe T, Watanabe T, Yanai K. Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1 receptor gene knockout mice. *Neuropharmacology.* 2002 Jun;42(8):1079-88.

Morales M, McCollum N, Kirkness EF. 5-HT(3)-receptor subunits A and B are co-expressed in neurons of the dorsal root ganglion. *J Comp Neurol.* 2001 Sep 17;438(2):163-72.

Moran Y, Gordon D, Gurevitz M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features. *Toxicon.* 2009 Dec 15;54(8):1089-101.

Mueller JL, Quock RM. Contrasting influences of 5-hydroxytryptamine receptors in nitrous oxide antinociception in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992 Feb;41(2):429-32.

Ness TJ. Pharmacology of peripheral analgesia. *Pain Pract.* 2001 Sep;1(3):243-54.

Netti C, Sibilio V, Guidobono F, Villani P, Pecile A, Braga PC. Evidence for an inhibitory role of central histamine on carrageenin-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology.* 1994 Feb;33(2):205-10.

Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett.* 2003 Feb 13;337(3):119-22.

Nicholson BD. Diagnosis and management of neuropathic pain: a balanced approach to treatment. *J Am Acad Nurse Pract.* 2003 Dec;15(12 Suppl):3-9.

Norton RS, Zwick J, Beress L. Natural-abundance <sup>13</sup>C nuclear-magnetic-resonance study of toxin II from *Anemonia sulcata*. *Eur J Biochem.* 1980 Dec;113(1):75-83.

Norton RS. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon.* 1991;29(9):1051-84.

Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* 2004 Apr 9;74(21):2643-53.

Ohkubo T, Shibata M, Inoue M, Kaya H, Takahashi H. Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1995 Jan 24;273(1-2):83-8.

Ohkubo T, Shibata M. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate regulation of substance P release via the prejunctional histamine H3 receptor. *European journal of pharmacology.* 1995 Apr 13;277(1):45-9.

Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E. 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. *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33323-35.

Oliveira JS, Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Konno K, Shida CS, Richardson M, Lucio AD, Beirao PS, de Freitas JC. 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 Oct;1764(10):1592-600.

Ortiz MI, Torres-Lopez JE, Castaneda-Hernandez G, Rosas R, Vidal-Cantu GC, Granados-Soto V. Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. *Eur J Pharmacol.* 2002 Mar 1;438(1-2):85-91.

Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2008 Jan;117(1):141-61.

Panula P, Yang HY, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(8):2572-6.

Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2923-8.

Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. *Pain.* 2005 Jan;113(1-2):185-90.

Passani MB, Bacciottini L, Mannaioni PF, Blandina P. Central histaminergic system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000 Jan;24(1):107-13.

Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. *Pain.* 1986 Jul;26(1):1-22.

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 Jan;276(1):116-24.

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience.* 1996 Jan;70(2):553-9.

Pierce PA, Xie GX, Peroutka SJ, Levine JD. Dual effect of the serotonin agonist, sumatriptan, on peripheral neurogenic inflammation. *Reg Anesth.* 1996 May-Jun;21(3):219-25.

Poveda R, Fernandez-Duenas V, Fernandez A, Sanchez S, Puig MM, Planas E. Synergistic interaction between fentanyl and the histamine H<sub>3</sub> receptor agonist R-(alpha)-methylhistamine, on the inhibition of nociception and plasma extravasation in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jul 10;541(1-2):53-6.

Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain.* 1996 Feb;64(2):345-55.

Raffa RB. Antihistamines as analgesics. *J Clin Pharm Ther.* 2001 Apr;26(2):81-5.

Ramam M, Bhat R, Garg T, Sharma VK, Ray R, Singh MK, Banerjee U, Rajendran C. A modified two-step treatment for actinomycetoma. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 Jul-Aug;73(4):235-9.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1957 Sep 1;111(4):409-19.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008 Oct;21(5):570-9.

Reichling DB, Levine JD. The primary afferent nociceptor as pattern generator. *Pain.* 1999 Aug;Suppl 6:S103-9.

Rodrigues AR, Duarte ID. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br J Pharmacol.* 2000 Jan;129(1):110-4.

Ronde P, Nichols RA. High calcium permeability of serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors on presynaptic nerve terminals from rat striatum. *J Neurochem.* 1998 Mar;70(3):1094-103.

Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3680-5.

Saegusa H, Matsuda Y, Tanabe T. [Structure and function of T-type calcium channels]. *Clin Calcium.* 2002 Jun;12(6):792-6.

Sander K, Kottke T, Stark H. Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists go to clinics. *Biol Pharm Bull.* 2008 Dec;31(12):2163-81.

Santos AR, De Campos RO, Miguel OG, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. The involvement of K<sup>+</sup> channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Eur J Pharmacol.* 1999 Aug 20;379(1):7-17.

Schaeffer RC, Jr., Randall H, Resk J, Carlson RW. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. *Toxicon.* 1988;26(1):67-76.

Schafer M, Imai Y, Uhl GR, Stein C. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol.* 1995 Jun 12;279(2-3):165-9.

Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 2004 Aug;389(4):237-43.



Schemelz M, Schmidt R, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjork HE. Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. *J Physiology*. 1994;480:389-94.

Schreier C, Hovius R, Costioli M, Pick H, Kellenberger S, Schild L, Vogel H. Characterization of the ligand-binding site of the serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor: the role of glutamate residues 97, 224, AND 235. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22709-16.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990 Nov;43(2):205-18.

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989 Sep;38(3):347-52.

Siegling A, Hofmann HA, Denzer D, Mauler F, De Vry J. Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001 Mar 9;415(1):R5-7.

Smith HS. Activated microglia in nociception. *Pain Physician*. 2010 May-Jun;13(3):295-304.

Snedecor GW, Sokal RR, Rohlf FJ. *Statistical methods Biometry*. In: Freeman WH, Co, editor. New York: Owa State University Press; 1946.

Sokal RR e Rohlf FJ. *Biometry*, W.H.F. Freeman and Co, editor. New York: 1981.

Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol*. 2004. Oct;30(2):117-25.

Sommer C. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Curr Pain Headache Rep*. 2006 Apr;10(2):101-6.

Suzuki T, Takamori K, Takahashi Y, Narita M, Misawa M, Onodera K. The differential effects of histamine receptor antagonists on morphine- and U-50,488H-induced antinociception in the mouse. *Life Sci*. 1994;54(3):203-11.

Taiwo YO, Levine JD. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. *J Neurosci*. 1991 Apr;11(4):928-32.

Taiwo YO, Levine JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*. 1992;48(2):485-90.

Thompson AJ, Lummis SC. 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Pharm Des*. 2006;12(28):3615-30.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Oct;51(1):5-17.

Tokunaga Y, Hata K, Nishitai R, Kaganoi J, Nanbu H, Ohsumi K. Spontaneous perforation of the rectum with possible stercoral etiology: report of a case and review of the literature. *Surg Today*. 1998;28(9):937-9.

Turk T, Kem WR. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. 2009; 54(8):1031-7.

Wanke E, Zaharenko AJ, Redaelli E, Schiavon E. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon*. 2009 Dec 15;54(8):1102-11.

Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*. 1990 Feb;40(2):229-38.

Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int*. 2004 Jul-Aug;45(2-3):389-95.

Woolf CJ. *Pain*. *Neurobiol Dis*. 2000 Oct;7(5):504-10.

Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med*. 2004 Mar 16;140(6):441-51.

Wootton M. Morphine is not the only analgesic in palliative care: literature review. *J Adv Nurs*. 2004 Mar;45(5):527-32.

Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Dec;8(12):982-1001.

Vanegas H, Schaible H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain*. 2000 Mar;85(1-2):9-18.

Vanderah TW. Pathophysiology of pain. *Med Clin North Am*. 2007 Jan;91(1):1-12.

Yaksh TL, Wilson PR. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979 Mar;208(3):446-53.

Yaksh TL, Tyce GM. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res*. 1979 Jul 27;171(1):176-81.

Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*. 1999 Aug;20(8):329-37.

Yan L, Herrington J, Goldberg E, Dulski PM, Bugianesi RM, Slaughter RS, Banerjee P, Brochu RM, Priest BT, Kaczorowski GJ, Rudy B, Garcia ML. Stichodactyla helianthus peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. *Mol Pharmacol*. 2005 May;67(5):1513-21.

Yeung SY, Thompson D, Wang Z, Fedida D, Robertson B. Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies. *J Neurosci*. 2005 Sep 21;25(38):8735-45.

Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., de Oliveira JS, Konno K, Richardson M, Schiavon E, Wanke E, de Freitas JC. 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.

Zaharenko AJ, Ferreira WA, Jr., Oliveira JS, Richardson M, Pimenta DC, Konno K, Portaro FC, de Freitas JC. 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 Sep;3(3):219-25.

Zaharenko AJ, Picolo G, Ferreira Jr WA, Murakami T, Kazuma K, Hashimoto M, Cury Y, Freitas JC, Katsuhiko K. Bunodosine 391: a new acylamino acid from the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products*. 2010. In press.

Zeitl KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):1010-9.