

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-ACILIDRAZONAS
NOS RECEPTORES CANABINOIDE CB1 E VANILOIDE TRPV1.

Alex da Silva Nismachin

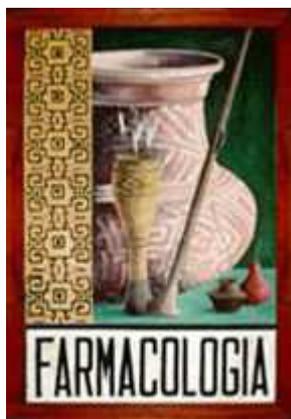
Rio de Janeiro
2014



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-ACILIDRAZONAS NOS RECEPTORES CANABINOIDE CB1 E VANILOIDE TRPV1.

Alex da Silva Nismachin



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Marília Zaluar Passos Guimarães

Rio de Janeiro

2014

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-ACILDRAZONAS NOS RECEPTORES CANABINOIDE CB1 E VANILOIDE TRPV1.

Alex da Silva Nismachin

Orientadora: Marília Zaluar Passos Guimarães

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência Biológicas.

Aprovada por:

Presidente, Professora Dra. Marília Zaluar Passos Guimarães - UFRJ

Professor Dr. Ricardo Augusto Melo Reis - UFRJ

Professora Dra. Josiane Sabbadini Neves - UFRJ

Professora Dra. Aline Guerra Fraga Manssour - UFRJ

Professora Dra. Gilda Angêla Neves – UFRJ

Rio de Janeiro

Maio, 2014

Nismachin , Alex da Silva.

Avaliação da relação estrutura-atividade de N-acildrazonas nos receptores canabinoide CB1 e vaniloide TRPV1./ Alex da Silva Nismachin.– Rio de Janeiro : UFRJ/ICB, 2014.

xvii, 74 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Marília Zaluar Passos Guimarães.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ/ICB, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências bibliográficas: f. 53-62.

1. Nociceptividade - fisiologia. 2. Nociceptores - fisiologia. 3. Eletrofisiologia. 4. Receptor CB1 de Canabinoide. 5. Canais de Cátion TRPV - farmacologia. 6. Microscopia de Fluorescência. 7. Farmacologia e Química Medicinal - Tese. I. Guimarães, Marília Zaluar Passos. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

Dedicatória

Aos meus amados pai e avó, que partiram durante o meu mestrado, mas que sempre viverão em meu coração e nas minhas lembranças, pelo amor infindável, por sempre me incentivarem a estudar e por tudo que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, por ter me proporcionado força, saúde e condições para me permitir concluir esse sonho que sempre tive.

A minha querida mãe, tudo isso seria impossível sem você, muito obrigado pelo seu amor na minha vida, seu suporte e suas palavras incentivadoras.

Agradeço minha família, pelo carinho, incentivo, ânimo e pelo apoio que sempre encontrei neles, essa conquista é de vocês também !

A minha orientadora Marília Zaluar Passos Guimarães por todo apoio que me deu, por sempre estar ao meu lado, pela santa paciência com as minhas eternas perguntas, por sempre estar disposta a me ensinar. Agradeço a ela por forjar em mim o caráter de um cientista, pelo olhar questionador, pelo incentivo e acima de tudo, por acreditar em mim e pelo seu imenso conhecimento compartilhado comigo. Te admiro muito MZPGuima!

Ao Prof^o. Newton G. Castro por ter me aceitado no LFM desde nosso primeiro contato telefônico. Eu não sabia que estava entrando para o melhor laboratório da UFRJ. Por todo o suporte, pela sua imensa paciência comigo e por tudo que aprendi com você.

Aos Professores Jorge Tributino e Gilda Neves do LFM que muito me ensinaram e pela paciência comigo. A Professora Gilda novamente pela sua imensa contribuição ao revisar a minha dissertação.

Ao Prof^o Ricardo Reis (Biofísica/UFRJ) pela ajuda com os neurônios e as técnicas de cultura, que foram muito importantes no desfecho da dissertação.

Aos grandes amigos do LFM, Priscilla Santanna, Fernanda Motta, Pedro Perdigão, Gina Castro, Carine Boa Morte, Gabriel Ferraz (Gibirú), Aparecida Marcelino, Gilberto Dalboni, Karen Ventura, Isis Oliveira, Marina Boni. Obrigado por cada segundo que compartilhamos! Foram muitos momentos de aprendizado, boas risadas, bons conselhos e várias conversas hilárias.

A três amigos que foram muito importantes no meu mestrado , que muito me ensinaram em fases diferentes, Diogo Munaro, Gabriel Soares e Mariana Vaz, devo muito a vocês meus amigos.

A uma amiga que conheci sentada ao meu lado na prova de admissão do mestrado e que nos tornamos grandes amigos, minha querida Camila Pão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, em especial ao Prof^o. Paulo Melo, a quem tive a honra de conhecer e sugar um pouco do seu conhecimento.

Ao apoio financeiro da Capes.

“Muitos dos nossos sonhos parecem impossíveis, depois improváveis, depois inevitáveis.” (Christopher Reeve)

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-ACILDRAZONAS NOS RECEPTORES CANABINOIDE CB1 E VANILOIDE TRPV1.

Alex da Silva Nismachin

Orientadora: Marília Zaluar Passos Guimarães

Resumo da dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia).

O desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir a dor tem sido árdua tarefa tanto para a indústria farmacêutica quanto para a academia. Dois sistemas estão intrinsecamente relacionados com a transdução e modulação da dor, o canabinoide, representado pelo receptor CB1 e o vaniloide (receptor TRPV1). Substâncias endógenas como a anandamida (AEA) agem sobre os dois sistemas, mostrando uma correlação entre os requisitos químicos de ação nos mesmos. O Laboratório de Síntese e Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) desenvolveu o LASSBio-294 que mostrou-se um agente anti-inflamatório brando. Visando melhorar essa função, foi realizada a hibridação do LASSBio-294 com a nimesulida, obteve-se o LASSBio-881 que possui ação de antagonista no receptor TRPV1 e agonista inverso CB1, enquanto que o 294 tem atividade agonista parcial CB1 e antagonista TRPV1. No presente trabalho estudamos uma série de moléculas com modificações pontuais entre o 294 e o 881, visando compreender a relação estrutura-atividade para cada uma dessas funções. Usando técnicas de eletrofisiologia em ovócitos e fluorescência de cálcio em células de gânglio da raiz dorsal, verificamos que a função antagonista TRPV1 depende do volume do substituinte lipofílico e que a capacidade de inibir o CB1 está relacionada com a presença do grupamento nitro. Esses achados serão úteis para o desenho de novas N-acilidrazonas tendo os receptores CB1 e TRPV1 como alvos farmacológicos.

Palavras-chave: Nocicepção, LASSBio 294, TRPV1 , CB1, Eletrofisiologia, Cálcio.

ABSTRACT

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE N-ACILDRAZONAS NOS RECEPTORES CANABINOIDE CB1 E VANILOIDE TRPV1.

Alex da Silva Nismachin

Supervisor: Marília Zaluar Passos Guimarães

Abstract of the master's dissertation presented to the Graduate Program in Pharmacology and Medicinal Chemistry, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro –UFRJ, as part of the requirements for obtaining a Master's degree in Science (Pharmacology).

The discovery of new drugs capable of inhibiting pain has been a great effort for the pharmaceutical industry and research laboratories. Two systems are intrinsically involved in the transduction and modulation of pain signals, the cannabinoid (CB1 receptor) and vanilloid (TRPV1 receptor). Endogenous substances, such as anandamide, act on both receptors, suggesting a common chemical signature for action in these systems. The Laboratório de Síntese e Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) has developed LASSBio-294, which has poor anti-inflammatory activity. Aiming at improving this function in similar molecules, LASSBio-294 was hybridized with nimesulide. From the series of molecules obtained, LASSBio-881 was shown to have TRPV1 and CB1 antagonistic activity, whereas LASSBio-294 is a TRPV1 partial agonist and antagonist. In the present work we investigated molecules with little modifications between 294 and 881, with the purpose of studying the structure-activity relationship for actions on CB1 and TRPV1. Using oocyte electrophysiology and calcium imaging in DRGs, we found that the antagonism at TRPV1 is dependent on the volume of the lipophilic substitute and that the antagonism at CB1 requires the presence of the nitro group. These findings will be useful for the design of new N-acylhydrazones targeting the CB1 and TRPV1 receptors.

Keywords: Nociception, LASSBio-294, TRPV1, CB1, Eletrophysiology, Calcium.

SUMÁRIO

	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
	LISTA DE FIGURAS	xv
	LISTA DE QUADROS	xvii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Dor	1
1.2	Nociceptores	2
1.3	Receptores TRPV1	8
1.3.1	Antagonistas TRPV1	10
1.3.2	Uso dos vaniloides em medicamentos	13
1.4	Sistema canabinoide	13
1.4.1	Receptores CB1 e CB2	14
1.4.2	Endocanabinoides	16
1.5	N-acilidrazonas do LASSBio	20
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Soluções	21
3.1.1	Eletrofisiologia	21
3.1.2	Células HEK 293	22
3.1.3	Gânglio da raiz dorsal (DRG)	23
3.2	Eletrofisiologia	24
3.2.1	Obtenção dos Ovócitos de <i>Xenopus laevis</i>	24
3.2.2	Injeção de cRNA	24
3.2.3	Registro Eletrofisiológico com Ovócitos	24
3.2.4	Análise dos resultados	25
3.3	Transfecção de Células HEK 293	26
3.3.1	Cultura de HEK 293	26
3.3.2	Transfecção	26
3.3.3	Replaqueamento	27
3.3.4	Solução de Azul de Tripán	27

3.3.5	Os corantes de cálcio	27
3.3.6	Análise de resultados	28
3.4	Cultura de Gânglio da Raiz Dorsal (DRG)	28
3.4.1	Preparo prévio das lamínulas	28
3.4.2	Cultura de DRG	28
3.4.3	Análise de resultados	30
4	RESULTADOS	30
4.1	Eletrofisiologia	30
4.2	Atividade TRPV1 em células HEK transfectadas	36
4.3	Análise das respostas de cálcio em neurônios sensoriais (DRG)	37
5	DISCUSSÃO	47
5.1	Eletrofisiologia	47
5.2	TRPV1 em células HEK transfectadas	48
5.3	Análise das respostas de cálcio em neurônios sensoriais (DRG)	48
5.4	Relação entre os presentes dados e dados in vivo	51
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERENCIAS	53

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Δ^9 -THC** – Delta 9 – Tetrahydrocannabinol
- 2-AG** – 2-Araquidonoilglicerol
- AEA** - Anandamida
- AMPc** - Adenosina 3',5' - Monofosfato ciclico
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BK** - Bradicinina
- BK2** – Receptor de bradicinina tipo 2
- CAP** - Capsaicina
- CB1** – Receptor Canabinoide 1
- CB2** – Receptor Canabinoide 2
- cRNA** – Ácido Ribonucleico complementar
- CGRP** - Peptidio relacionado ao gene da calcitonina
- CPZ** - Capsazepina
- CR** – Concentração x resposta
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DRG** – Gânglio da raiz dorsal
- DMEM-F12** – Meio Eagle modificado por Dubelccco F12
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- EC50** – Concentração eficaz 50%
- GABA** – Ácido gama-aminobutírico
- GDNF** – Fator neurotrófico derivado da glia
- GPCR** – Receptor acoplado a proteína G
- KIR 3.3 e KIR 3.4** – Canais retificadores de potássio
- HEPES** – Ácido hidroxietil piperazinoetanosulfônico
- LASSBio** – Laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas
- MAPK** – Proteína cinase ativada por mitógeno
- Na_v** – Canal de sódio dependente de voltagem
- NMDA** – *N*-metil-*D*-aspartato
- NGF** – Fator de crescimento neural
- NT** – Neurotransmissores

PIP2 - Fosfatidil 4',5'-bifosfato
PEA – *N*-palmitoiletanolamina
PG - Prostaglandina
PKA – Proteína cinase A
PLC – Fosfolipase C
PTX – Toxina pertússica
SNC – Sistema nervoso central
RET – Receptor RET
RR - Vermelho de rutênio
TrkA – Receptor de tirosina cinase A
TRP – Potencial receptor transitório
TRPV1 – Potencial receptor transitório vaniloide tipo 1
TTX – Tetrodotoxina
VC – Velocidade de condução
VR1 – Receptor vanilóide tipo 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação da dor.....	3
Figura 2: Anatomia dos nociceptores.....	5
Figura 3: Sensibilização de um nociceptor.....	6
Figura 4: Terminal de um nociceptor:.....	7
Figura 5: Representação do receptor TRPV1.....	9
Figura 6: A) Estrutura química da Capsaicina. B) Sítios de ligação de várias substâncias e estímulos ao receptor TRPV1.....	9
Figura 7: Antagonistas TRPV1.....	11
Figura 8: Grupamentos chaves de um antagonista TRPV1.....	12
Figura 9: Estrutura química do Δ^9 -THC e WIN 55.212-2.....	13
Figura 10: Esquema mostrando a sinalização (parte) por receptores CB1.....	15
Figura 11: Endocanabinóides.....	17
Figura 12: Estrutura química do rimonabanto.....	18
Figura 13: Síntese do LASSBio 881.....	19
Figura 14: Substâncias do LASSBio.....	21
Figura 15: Corrente típica de capsaicina em ovócito expressando TRPV1.....	31
Figura 16: LASSBios como agonistas de baixa eficácia.....	32
Figura 17: Curva CR do LASSBio-294 como agonista do TRPV1.....	32
Figura 18: LASSBios co-aplicados com solução pH 5,5.....	33
Figura 19: LASSBios como antagonistas do TRPV1 em pH 7.6.....	34
Figura 20: LASSBios como antagonistas do CB1.....	35
Figura 21: Curvas CR à capsaicina na presença ou não de 20 μ M de LASSBio-881 em células HEK293 transfectadas.....	36
Figura 22: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios B) Quantificação.....	37
Figura 23: A) Traçado DRG com capsaicina/vermelho de rutênio (RR) e capsaicina com RR. B) Quantificação.....	39
Figura 24: A) Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-881 e capsaicina com LASSBio-881. B) Quantificação.....	40

Figura 25: A)Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-294 e capsaicina com LASSBio-294. B) Quantificação	41
Figura 26: A)Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-945 e capsaicina com LASSBio-945. B) Quantificação	42
Figura 27: A)Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-123 e capsaicina com LASSBio-123. B) Quantificação	43
Figura 28: A)Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-882 e capsaicina com LASSBio-882. B) Quantificação	44
Figura 29: A)Traçado DRG com capsaicina/LASSBio-897 e capsaicina com LASSBio-897. B) Quantificação	45
Figura 30: (A) Comparação das atividades dos LASSBios aplicados sozinhos (teste para agonistas) (B)Comparação das atividades dos LASSBios coaplicados com capsaicina (ou RR) e a segunda aplicação de capsaicina apresentada na figura 21 (** <i>P</i> <0,001).....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Tipos de fibra e suas características.....	4
Quadro 2: Comparação dos efeitos das substâncias testadas quando co-aplicadas com capsaicina.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor aguda funciona como um sensor que serve para nos proteger de estímulos nocivos como calor, frio extremo, algumas substâncias químicas e danos teciduais mecânicos (Stemkowski e Smith, 2012). Sem a habilidade de sentir dor aguda, o organismo não se sente impelido a dar fim à atividade que promove a injúria, mesmo que seja algo nocivo e perigoso. Assim, pessoas com essa insensibilidade congênita à dor, que é causada por problemas em genes diferentes, correm perigo constantemente e tendem a não viver muito (Danziger e Willer, 2009).

A dor crônica, por sua vez, é difícil de tratar e geralmente causa um impacto muito negativo na qualidade de vida dos pacientes (Poliakov e Toth, 2011) e um gasto de aproximadamente US\$ 600 bilhões somente nos Estados Unidos (Institute of Medicine (US), 2011). Por isso e pelo fato de que a eficácia e/ou segurança dos fármacos atuais é limitada, busca-se novos analgésicos para tratamento de dores crônicas. A dor crônica envolve mudanças na expressão/função de diferentes tipos de canais iônicos em neurônios sensoriais periféricos, bem como no sistema nervoso central (Von Hehn *et al.*, 2012). Algumas das mudanças são super-regulação de receptores de *N*-metil-*D*-Aspartato (NMDA) e canais de cálcio dependente de voltagem no corno da raiz dorsal (Weyerbacher *et al.*, 2010).

A dor pode ser classificada em 3 tipos. O primeiro tipo é a dor do estado inicial de alerta fisiológico do sistema de proteção, essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos nocivos. Esta é a dor que sentimos quando tocamos algo muito quente, gelado ou pontudo e esta dor está diretamente ligada à sensação proveniente de um estímulo nocivo, e é chamada de dor nociceptiva (Figura 1 A). Possui um limiar relativamente alto de ativação e logo só é acionada frente a um estímulo intenso (Basbaum *et al.*, 2009c).

O segundo tipo de dor também é adaptativa e de proteção, a chamada dor inflamatória. Por aumentar a sensibilidade sensorial após um dano tecidual, essa dor auxilia na recuperação da parte do corpo atingida, criando uma situação que desestimula o contato físico e o movimento. Isso ocorre porque é gerada uma hipersensibilidade à dor no local inflamado, fazendo com que ocorra a alodinia (um estímulo inócuo passa a provocar dor) e hiperalgesia (um estímulo que já seria doloroso provoca mais dor ainda). Esta dor é causada pela ativação do sistema imunológico pela injúria tecidual ou infecção (Figura 1B) (Basbaum et al., 2009b).

Finalmente há a dor que não é protetora, mas que resulta do funcionamento anormal do sistema nervoso. Essa dor patológica (Figura 1C), não compreende um sintoma de algum distúrbio, mas se trata de uma doença do próprio sistema nervoso. Esse tipo de dor pode ocorrer após algum dano ao sistema nervoso (dor neuropática), e também em condições em que não há dano ou inflamação (dor disfuncional) como em fibromialgia, síndrome do colo irritável, doença da articulação temporomandibular, cistites intersticiais e outras síndromes em que existe dor substancial mas não um estímulo que explique a origem desta dor e nenhuma inflamação periférica. A sensação que sentimos nestes 3 casos nós chamados de dor, mas devido ao processo de origem de cada uma delas, o tratamento deve ser direcionado para cada mecanismo responsável pela sua origem (Woolf, 2010b).

1.2 Nociceptores

Os estímulos nocivos são detectados por nociceptores primários que se localizam em terminais periféricos na superfície corpórea ou em órgãos internos. Os corpos celulares desses neurônios se encontram nos gânglios da raiz dorsal (DRG) ou nos gânglios trigêmeos (Basbaum et al., 2009a). Em humanos há 29 pares de DRG (um em cada nível vertebral) e um par de gânglios trigêmeos. Estes neurônios possuem uma morfologia peculiar com uma projeção axonal unipolar chegando ao corpo celular e bifurcando-se em 2 vias, uma muito longa que termina nas áreas periféricas sensoriais e a segunda projeção que se conecta com o sistema nervoso central (SNC) na medula espinhal ou no tronco cerebral (Tandrup, 1995). A parte

distal detecta o estímulo nocivo, gerando potenciais de ação que são propagados ao longo da fibra axonal até as sinapses centrais no SNC (Devor, 1999) (Figura 2).

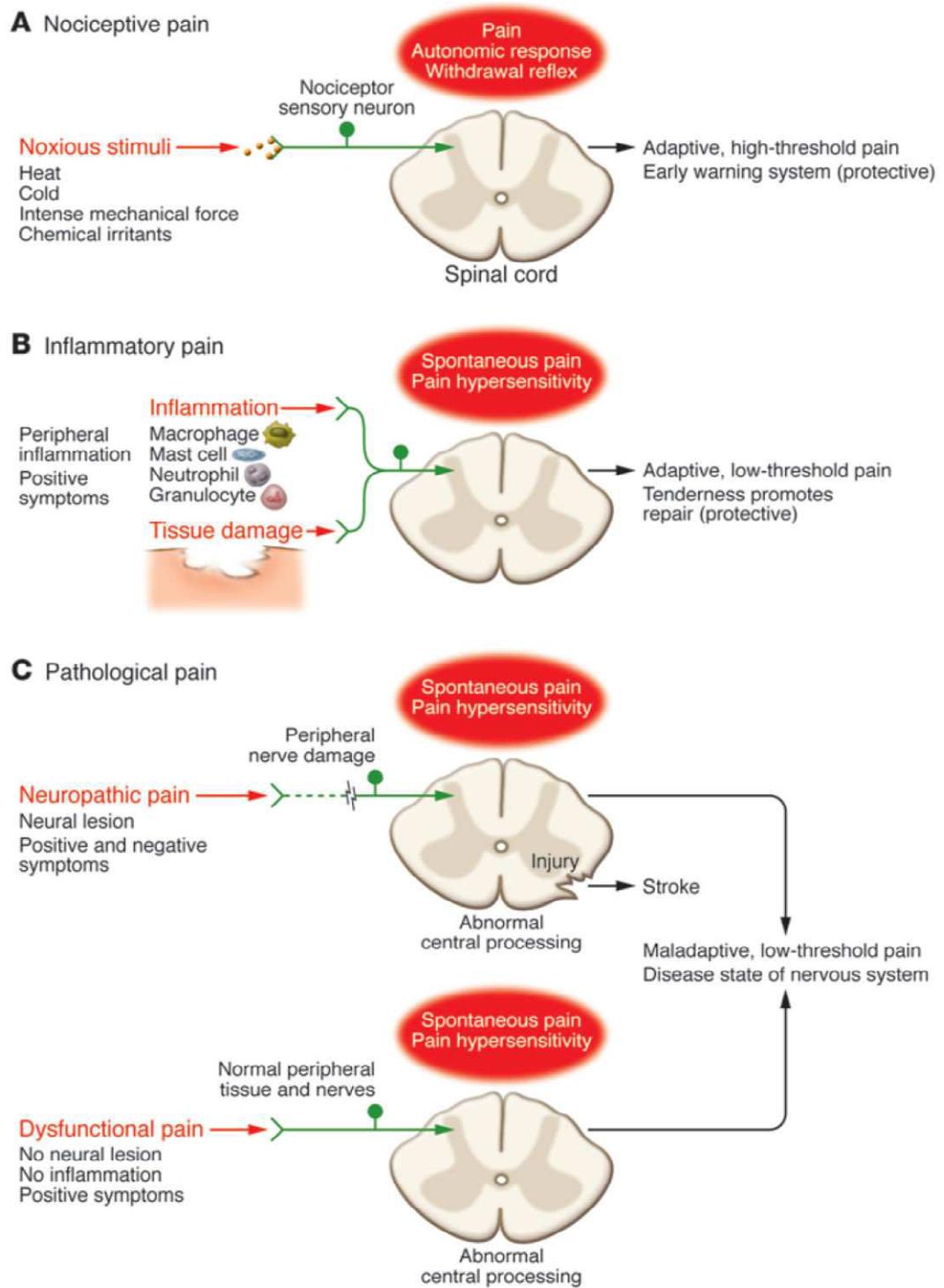


Figura 1: Classificação da dor: (A) Dor nociceptiva representa a sensação associada com a detecção de um estímulo potencialmente nocivo de dano tecidual. (B) Dor inflamatória é associada a um dano

tecidual e ao infiltrado de células imunes que promove o reparo devido a hipersensibilidade. (C) Dor patológica é causada pelo dano ao sistema nervoso (Neuropática) ou por sua função anormal (disfuncionalidade) (Woolf, 2010a).

A classificação das fibras sensoriais depende de suas funções (Velocidade de condução – VC) e de suas características anatômicas (Perl, 2007). As principais fibras envolvidas no processo de transmissão dos estímulos sensoriais estão descritas no quadro abaixo (Quadro 1) com suas principais características (Zotterman, 1939; Julius e Basbaum, 2001b).

Quadro 1 : Tipos de fibras e suas características

FIBRA NERVOSA	DIAMETRO (μM)	VELOCIDADE (M/S)
A α (Mielinizada)	5-20	70-120
A β (Mielinizada)	5-20	30-70
A δ (Mielinizada)	2-5	12-30
C (Não mielinizada)	0.5-1	0.5-2

Os neurônios nociceptivos são caracterizados em 2 tipos, de acordo com a expressão de alguns marcadores. O primeiro grupo são dos que dependem do fator de crescimento neural (NGF), que expressam os receptores de tirosina cinase tipo A (TrKA) e liberam substância P (Figura 3). O segundo compreende os neurônios que são responsivos ao fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), que expressam os receptores RET (receptores tirosina cinase com único domínio transmembranar responsável pelo crescimento e manutenção de vários tecidos e células), não liberam a substância P, podem ser diferenciados pela marcação seletiva com α -D-galactosil Lectina IB4, e expressam os receptores P2X3, um canal iônico purinérgico (Hokfelt *et al.*, 1994; Molliver *et al.*, 1995; Molliver *et al.*, 1997).

O potencial receptor transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) está presente na população de neurônios não-mielinizados de lenta condução (Fibras C) e também nas fibras levemente mielinizadas (Fibras A δ) que expressam as substâncias peptídicas substância P, neurocinina A e o peptídeo relacionado ao gene da

calcitonina (CGRP), que constitui aproximadamente 30-50% de todos os neurônios sensoriais dos gânglios dorsais (Tominaga et al., 1998a; Kobayashi et al., 2005)

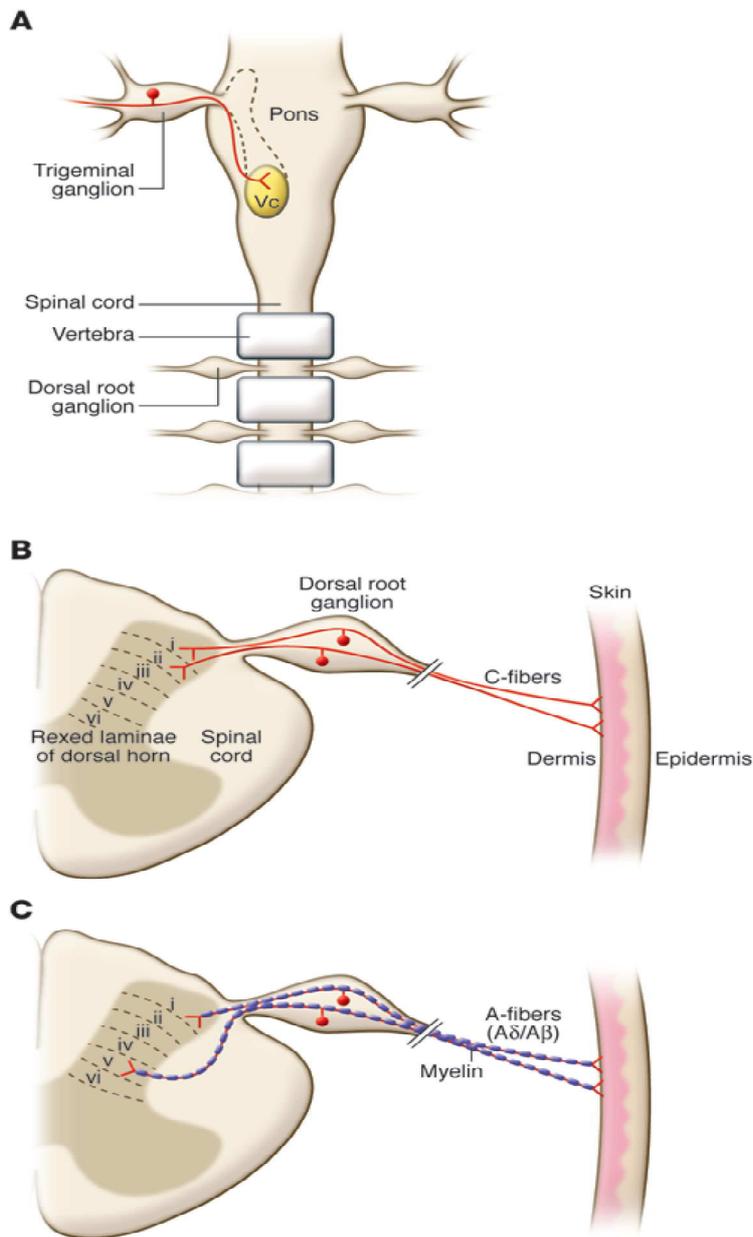


Figura 2: Anatomia dos nociceptores. (A) Neurônios sensoriais estão localizados em gânglios periféricos (Trigêmeo e gânglio da raiz dorsal). (B) Muitos nociceptores são amielinizados com axônios de pequeno diâmetro (Fibras C em vermelho), sua aferência periférica inerva a pele (derme e/ou epiderme) e o processo central se projeta para a superfície da lâmina I e II do corno dorsal da medula. (C) As fibras A são mielinizadas e possuem velocidade de condução maiores que as C. As fibras A se projetam para a superfície da lâmina I e V. (Dubin e Patapoutian, 2010)

Em um terminal de nociceptor existem várias proteínas receptoras que agem conjuntamente regulando a sensibilidade do mesmo, através da influência de um sobre os outros. É o caso dos receptores de bradicinina do tipo 2 (BK2), TrkA de NGF, canabinoides (CB1), os receptores de potencial transitório do tipo V1 (TRPV1) e de prostaglandinas (PG), como mostra a figura 4.

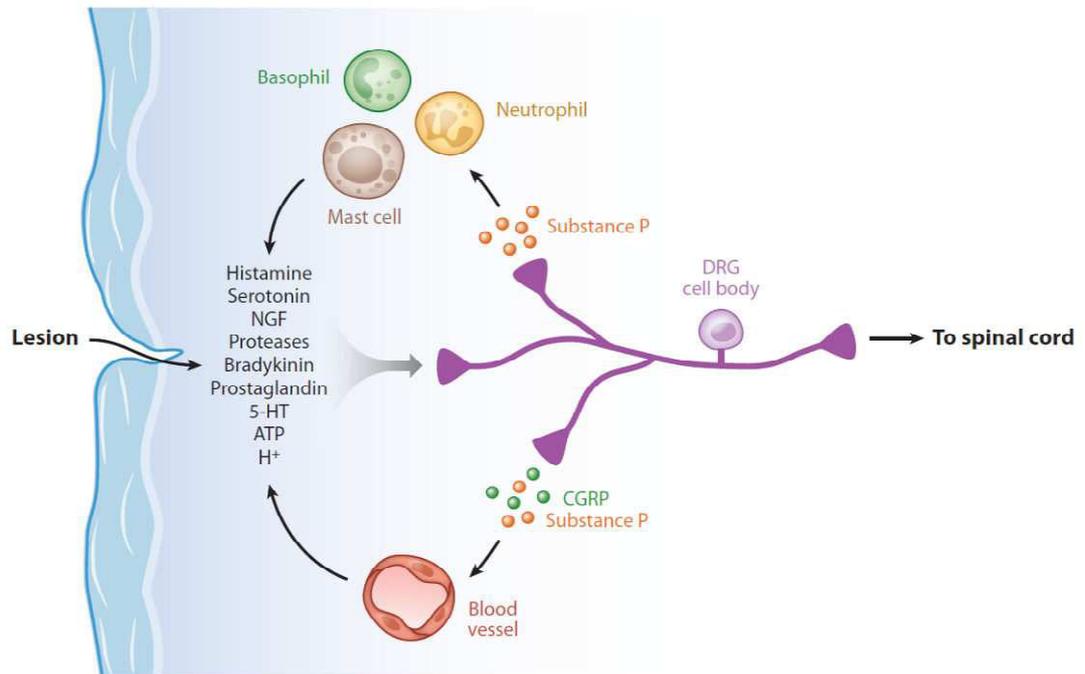


Figura 3: Sensibilização de um nociceptor por injúria tecidual ou inflamação. Os nociceptores aferentes primários (neurônios púrpura) são ativados por estímulos térmicos, químicos ou mecânicos. Uma vez ativadas, essas fibras transmitem sinais nocivos para neurônios secundários na raiz dorsal da medula, e estes ao SNC gerando uma percepção de desconforto agudo ou dor. Na periferia, transmissores são liberados como a substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que provocam vasodilatação e com isso o extravazamento vascular. Essas ações promovem o recrutamento de células imunes, conhecida como inflamação neurogênica. A “sopa” inflamatória gerada no local contém neurotrofinas, prostanóides, lipídios bioativos, prótons extracelulares, nucleotídeos e monoaminas que interagem cada um com seu receptor específico no nociceptor, para aumentar sua sensibilidade a estímulos físicos ou químicos. Esse fenômeno representa a chave pelo qual a injúria tissular provoca a hipersensibilidade a dor. (Julius, 2013)

O NGF é importante para o desenvolvimento do neurônio em períodos embrionários, mas depois na fase adulta ele causa sensibilização aguda de respostas que envolvem a ativação do TRPV1 (Shu e Mendell, 1999). O NGF ao se ligar ao receptor TrkA ativa a sinalização via fosfolipase- γ (PLC- γ) (Ganju et al., 1998), potencializando as ações do TRPV1 de maneira semelhante à bradicinina (Womack *et al.*, 2000). Os nociceptores expressam os canais de sódio dependente

de voltagem dos subtipos Na_v 1.8 e Na_v 1.9 que são resistentes a tetrodotoxina (TTX) (Baker e Wood, 2001). Já a prostaglandina PGE_2 diminui o limiar de ativação dos canais de sódio pela fosforilação da proteína do canal pela proteína cinase A (PKA) dependente de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), que tem sua concentração aumentada com a ativação do receptor de prostaglandina (England et al., 1996). O receptor canabinoide CB1 por sua vez atua reduzindo os níveis de AMPc, pela inibição de sua enzima precursora, adenilato ciclase, e com isso não ativa a proteína cinase A (PKA), o que aumenta o limiar de excitabilidade do nociceptor, exercendo assim uma ação contrária ao do receptor de PGE_2 (Howlett, 1995).

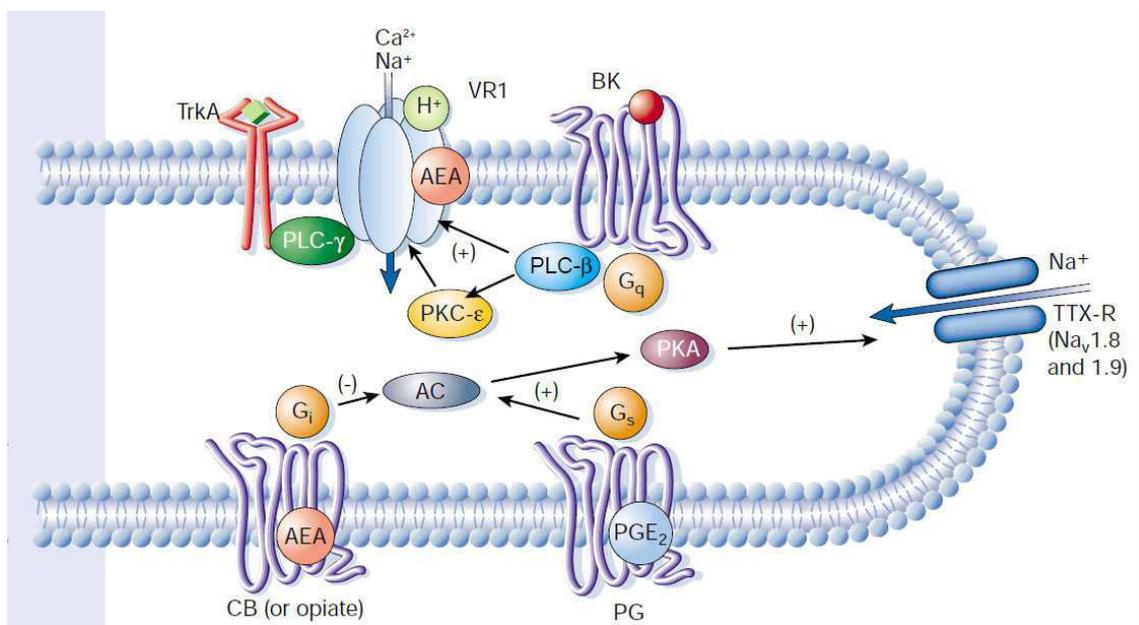


Figura 4: Terminal de um nociceptor: Quando exposto a neurotransmissores e agentes pró-inflamatórios tem sua sensibilidade alterada através de mecanismos intra e extracelulares. O receptor vaniloide TRPV1 (VR1) e os canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v 1.8 e 1.9) resistentes a tetrodotoxina (TTX-R) aparecem como alvos de modulação. Respostas do TRPV1 ao calor podem ser potencializadas pela interação direta do canal com os prótons extracelulares (H^+), alguns eicosanoides e pelo endocanabinoide anandamida (AEA). O TRPV1 pode ser sensibilizado por agentes como NGF ou bradicinina, que se ligam aos seus próprios receptores (TrkA e BK respectivamente) e estimulam a fosfolipase C (PLC- γ ou PLC- β , respectivamente), o que leva à hidrólise de fosfolípidios de membrana e conseqüentemente à perda da inibição exercida pelo fosfatidil 4',5'-bifosfato (PIP2) no TRPV1, além da estimulação da isoforma da proteína cinase C, como PKC- ϵ . Propõe-se que essas ações potenciam as funções do TRPV1. As prostaglandinas, através de seu receptor (PG), e os canabinoides em seus receptores (CB), ambos com ação sobre a enzima adenilato ciclase exercem ações antagônicas: as prostaglandinas diminuem e os canabinoides aumentam o limiar de ativação para abertura do canal de sódio dependente de voltagem. (Julius e Basbaum, 2001a)

Após uma lesão tecidual, muitas substâncias são liberadas no meio extracelular (Levine e Reichling, 1999). Entre as várias substâncias liberadas, está a

bradicinina (BK), que é capaz de provocar despolarização imediata se adicionada a uma cultura de nociceptores (Burgess *et al.*, 1989). A BK se liga ao receptor BK2 que induz a hidrólise pela fosfolipase C (PLC) do fosfatidil 4'5'-bifosfato (PIP₂), causando um aumento intracelular da concentração de Ca⁺², proveniente dos estoques do retículo endoplasmático. Além disso também causa a ativação da proteína cinase C (PKC) da isoforma-ε, que fosforila o receptor TRPV1, diminuindo assim seu limiar de ativação (Cesare e McNaughton, 1996; Premkumar e Ahern, 2000).

1.3 Receptores TRPV1

Os canais de potencial receptor transitório (TRPs) foram descritos pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* em 1989 (Montell e Rubin, 1989). Hoje cerca de 30 TRPs são conhecidos, e eles respondem a estímulos térmicos, químicos (pH, lipídios) e a vários outros vindos do meio intra ou extracelular (Nilius e Voets, 2005; Mathie, 2010; Nieto-Posadas *et al.*, 2011; Garrison e Stucky, 2011).

Seis divisões dos canais TRP foram identificados: TRPC (Canônico), TRPV (Vaniloide), TRPM (Melastina), TRPA (Anquirina), TRPP (Poli-Cistina) e TRPML (Mucolipin), mas sem dúvidas o TRPV1 continua como o mais conhecido e estudado (Patapoutian *et al.*, 2009; Nieto-Posadas *et al.*, 2011). O receptor TRPV1, conhecido anteriormente como receptor vaniloide tipo 1 (VR1), foi identificado como receptor do composto vaniloide capsaicina (Caterina *et al.*, 1997a). A capsaicina, ou *trans*-8-metil-*N*-vanilil-6-nonamida, é um alcaloide de ocorrência natural em algumas plantas do gênero *Capsicum*, mais conhecidas como as pimentas vermelhas (Figura 6A). O TRPV1 é expresso em receptores polimodais e acredita-se que sua função seja como um integrador molecular de estímulos nocivos, como calor, vaniloides, ácidos, toxinas e substâncias endógenas pró-inflamatórias (*N*-araquidonoildopamina, produtos da lipooxigenase provenientes do ácido araquidônico e anandamida) (Figura 6B) (Tominaga *et al.*, 1998b);(Caterina *et al.*, 2000);(Tominaga e Julius, 2000); (Caterina e Julius, 2001).

O Canal TRPV1 é uma proteína homotetrâmera com cada subunidade formada por 6 domínios transmembranares (Figura 5) (Kedei *et al.*, 2001a; Tominaga

e Tominaga, 2005). A estrutura em alta resolução do TRPV1 foi descrita por Liao e colaboradores em 2013 (Liao *et al.*, 2014).

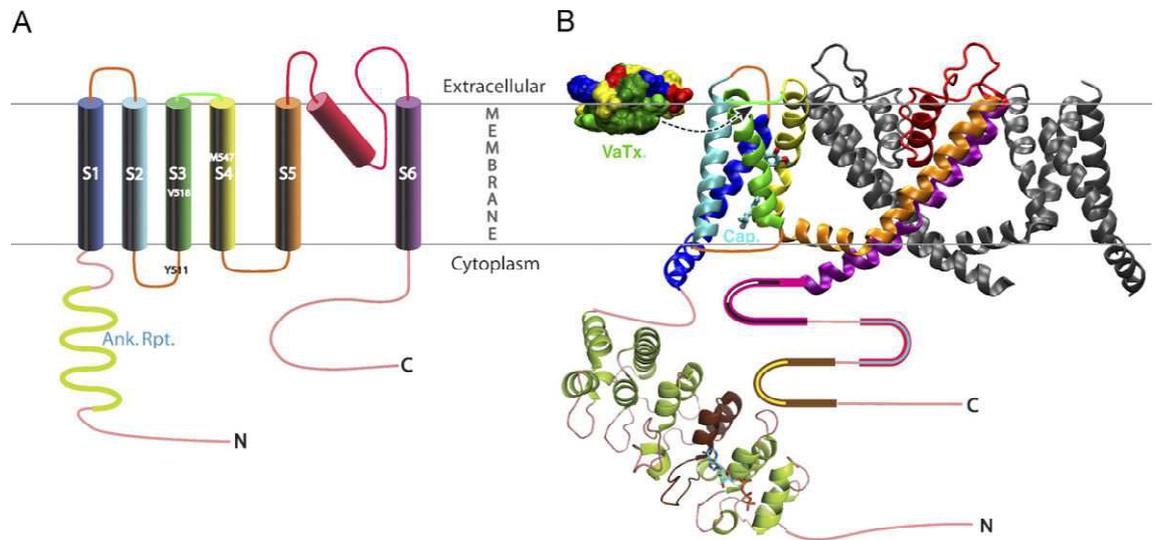


Figura 5: Representação do receptor TRPV1. (A) Estrutura em cilindros, (B) Estrutura em fitas (Cromer e McIntyre, 2008).

O TRPV1 de rato tem peso molecular de 95 kDa, uma proteína integral de membrana formada por 838 aminoácidos cada subunidade (839 em humanos), com uma homologia de 98%. A região transmembranar está entre os resíduos 433–684, consistindo de 6 segmentos helicais transmembranares, S1–S6, e mais um “*P-loop*”. Esse *loop* juntamente com as hélices S5 e S6 formam o poro iônico com seletividade para cátions (Caterina *et al.*, 1997b; Owsianik *et al.*, 2006). As outras regiões, como as porções N e C terminais intracelulares formam uma grande região citoplasmática que compreende cerca de 70% da massa da proteína total. O TRPV1 exerce sua função como um canal iônico tetramérico não-seletivo com uma alta permeabilidade para o cálcio (ordem de permeabilidade: $\text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+} \sim \text{K}^{+} \sim \text{Cs}^{+}$) (Kedei *et al.*, 2001b; Niemeyer, 2005).

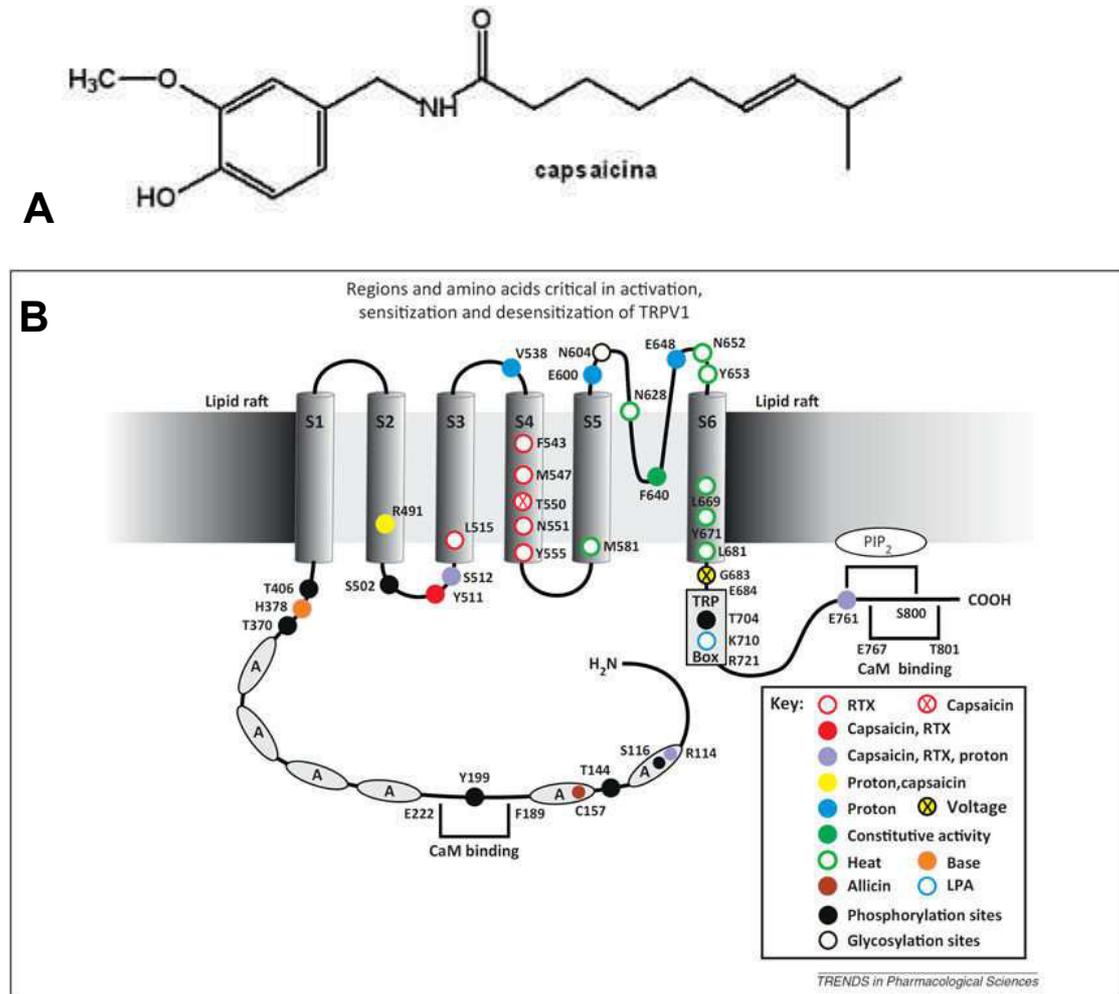


Figura 6: A) Estrutura química da Capsaicina. B) Sítios de ligação de várias substâncias e estímulos ao receptor TRPV1 (Szolcsanyi e Sandor, 2012).

O TRPV1 é chamado por alguns pesquisadores como o "receptor canabinoide ionotrópico", pois pode também ser ativado por endocanabinoides (Di Marzo *et al.*, 2002). Uma vez ativado, o receptor TRPV1 possibilita o influxo de cátions, predominantemente íons cálcio (Marsh *et al.*, 1987; Wood *et al.*, 1988), e, caso a ativação seja intensa o suficiente, provocará a despolarização do nociceptor e a geração de potenciais de ação. Essa ativação é transmitida do neurônio de primeira para o de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, através de neurotransmissores tais como glutamato, adenosina tri-fosfato (ATP), e uma variedade de outros neuropeptídeos (Holzer, 1991; Lundberg, 1996).

1.3.1 Antagonistas TRPV1

As substâncias abaixo são antagonistas TRPV1. A capsazepina (CPZ) é o antagonista competitivo mais utilizado, enquanto que o vermelho de rutênio (RR) é não-competitivo (Figura 7) (Wang e Hakanson, 1993).

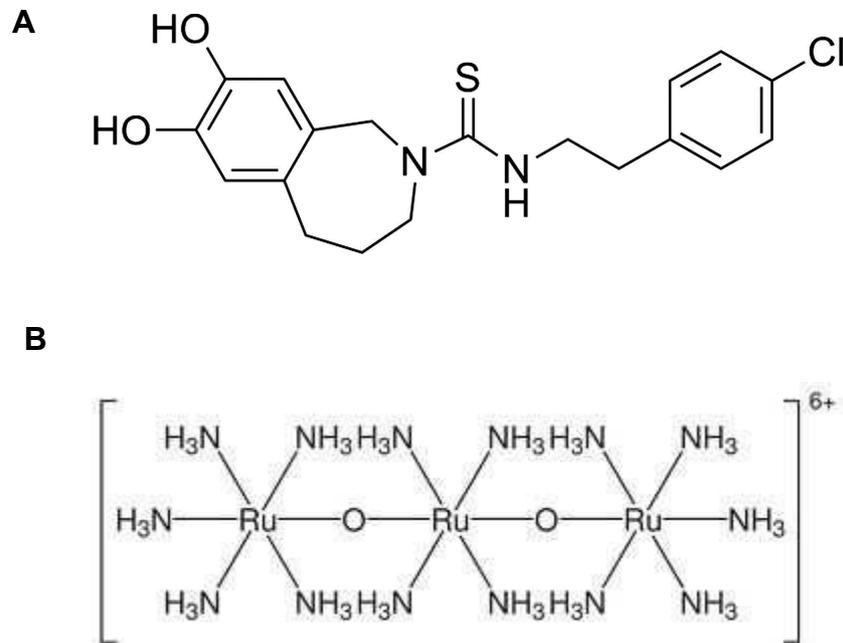


Figura 7:Antagonistas TRPV1.(A) Capsazepina (CPZ) e (B) vermelho de rutênio (RR).

Antagonistas do TRPV1 descritos até o momento possuem em geral uma subunidade aromática acceptora de ligações de hidrogênio ou interações com grupamentos arila (I), uma cadeia ligadora a um outro acceptor/doador de ligações de hidrogênio (II), mais uma cadeia *linker* ligada a um grupo lipofílico (III) (Szallasi et al., 2007a). Nas substâncias estudadas, a subunidade I seria a benzodioxola (com ou sem o grupamento nitro), a II a N-acilidrazona e a III o substituinte variável (ditercbutila, tiofenila, benzila). O posicionamento dos substituintes no anel aromático parece ser crítico para a potência do antagonista no TRPV1, sendo a posição 4 a mais eficaz (Szallasi et al., 2007b) (Figura 8).

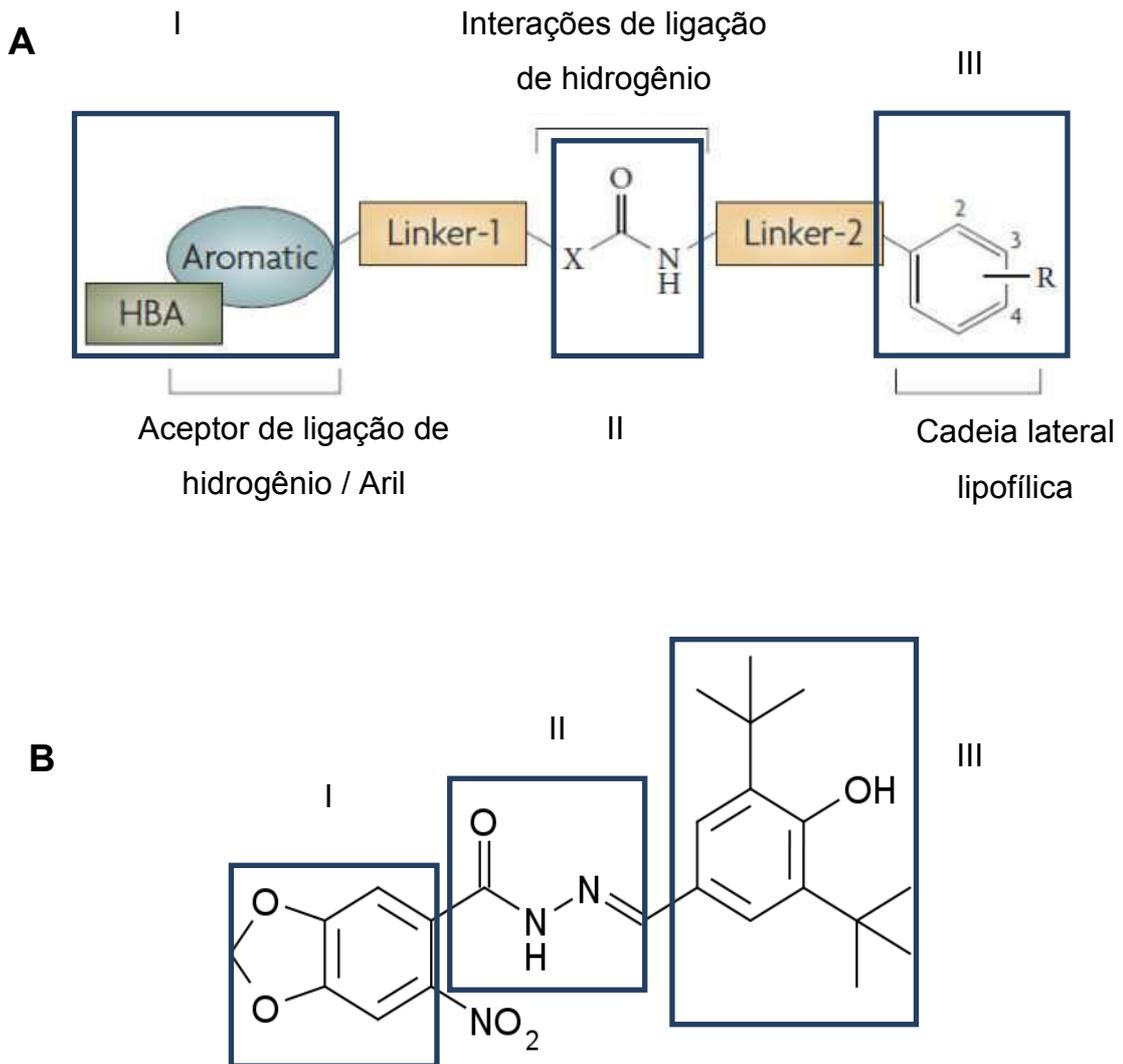


Figura 8 : (A) Grupos-chaves em um antagonista TRPV1 (Szallasi, 2007) (B) LASSBio 881.

Essa subunidade aromática da molécula interage com aminoácidos presentes nas regiões transmembranares, se a orientação que antagonistas assumem no receptor forem semelhantes à da capsaicina. A capsaicina deve entrar na célula e se orientar pelo citoplasma, alinhando o grupamento vaniloide com aminoácido aromático situado na borda do receptor com o citoplasma (uma tirosina), e projetando o restante da molécula para dentro do receptor, entre os domínios transmembranares 2 e 3 (Jordt e Julius, 2002b). Sabe-se entretanto que a porção hidrofóbica de antagonistas competitivos do TRPV1 interage com os domínios transmembranares 5 e 6, domínios esses formadores do poro do canal (Kym *et al.*, 2009). E que o volume desses substituintes é crucial para o efeito antagonista.

1.3.2 Uso dos vaniloides em medicamentos

A Johnson & Johnson comercializa há muitos anos o Emplastro Sabiá® que contém 0,025 mg de extrato de *Capsicum sp* por unidade, e é usado contra dores musculares. Pastas, cremes e adesivos cutâneos à base de capsaicina são usados com a função analgésica como o Qutenza® do laboratório americano Acorda, pois causam dessensibilização do receptor e consequente esvaziamento dos estoques de substância P, um neuropeptídeo liberado pelas fibras nervosas C, desta forma interrompendo a neurotransmissão na medula (Bernstein *et al.*, 1986). O receptor TRPV1 é um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos pois ele está envolvido no processo de transmissão da dor, e no entanto, tem uma expressão bem restrita, o que acarretaria em teoricamente poucos efeitos adversos para um novo fármaco (Pertwee *et al.*, 2010).

1.4 Sistema canabinoide

A planta *Cannabis sativa* possui dezenas de substâncias bioativas, sendo a mais conhecida e também mais abundante o Δ^9 -THC (tetrahidrocanabinol). Seu isolamento foi realizado em 1964 pelo Profº Raphael Mechoulam, quando identificou-se o Δ^9 -THC como a principal substância ativa da *C. sativa* (Mechoulam e Gaoni, 1965) (Figura 9).

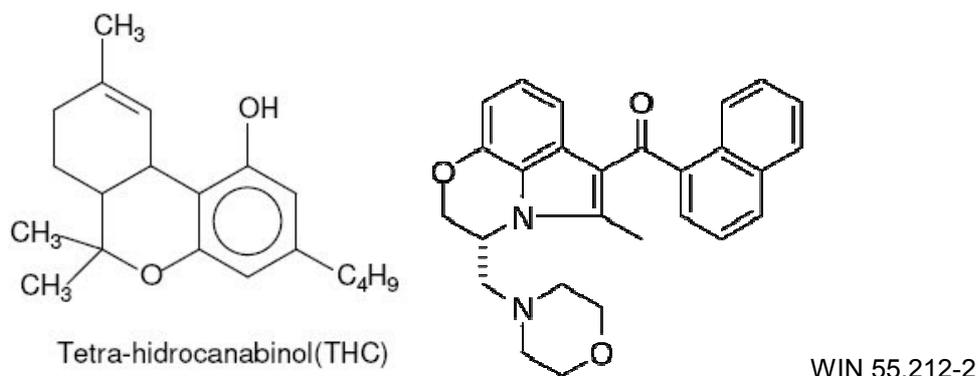


Figura 9: Estrutura química do Δ^9 -THC e do agonista sintético WIN 55.212-2

Originalmente se acreditava que os canabinoides agiam através de um mecanismo associado inespecífico, entretanto, a alta estereosseletividade de alguns canabinoides sintéticos apontaram para um mecanismo mais característico (Mechoulam *et al.*, 1988). As primeiras pistas de que os canabinoides agiam por receptores foram publicadas por Howlett (1986), que demonstrou que os canabinoides inibiam a ativação da adenilato ciclase. Esse mesmo grupo caracterizou a existência de sítios de ligação específica no SNC (Devane *et al.*, 1988). Essa distribuição era consistente com as propriedades farmacológicas dos canabinoides psicotrópicos (Herkenham *et al.*, 1990).

Foi na década de 90 que foram descobertos receptores específicos para canabinoides localizados no SNC e fora dele, bem como uma possível modulação na resposta de outros sistemas de neurotransmissores (Matsuda *et al.*, 1990a).

1.4.1 Receptores CB1 e CB2

A descoberta em 1990 de um receptor acoplado a proteína G proveniente do córtex cerebral do rato, que mediava os efeitos farmacológicos do Δ^9 -THC, o principal constituinte ativo da *Cannabis sativa*, marcou a identificação do primeiro receptor canabinoide, chamado CB1 (Matsuda *et al.*, 1990b). Três anos depois um receptor acoplado a proteína G expresso em promielócito leucêmico da linhagem HL 60, foi identificado como o segundo receptor canabinoide e foi chamado então de CB2 (Munro *et al.*, 1993). Os receptores CB1 e CB2 são membros da superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Ambos os receptores atuam inibindo a adenilato ciclase e ativando a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Howlett, 2002f; Howlett, 2005), por sinalização celular através da proteína $G_{i/o}$ que, no receptor CB1, também medeia a ativação das correntes de potássio retificadoras e inibe as correntes de cálcio dos tipos N/P e Q, mostrado na figura 9. Além do sítio ortostérico, o receptor CB1 possui um ou mais sítios alostéricos que podem ser alvos de ligantes de modo a aumentar ou diminuir sua ativação por agonistas (Adam *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009).

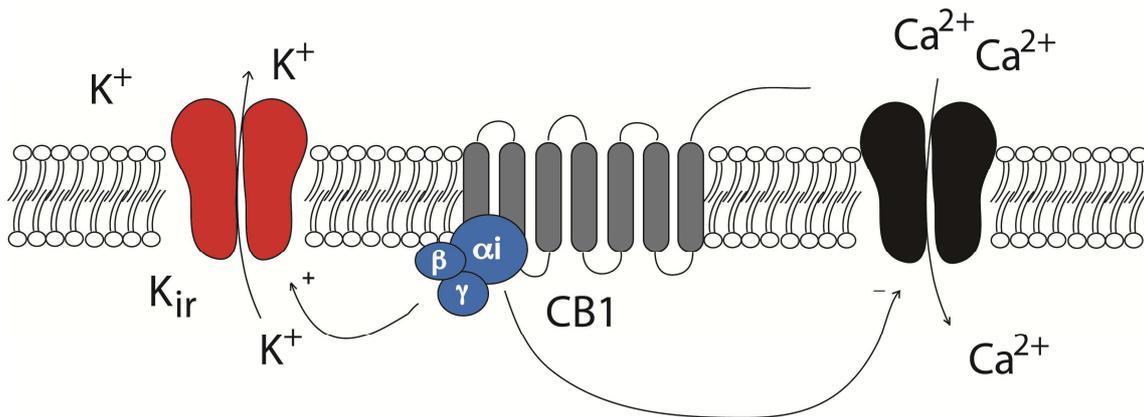


Figura 10: Esquema mostrando a sinalização (parte) por receptores CB1. Ao ser ativado, o CB1 ativa uma proteína $G_{i/o}$ que por sua vez inibirá canais de cálcio dependentes de voltagem e também a adenilato ciclase (não mostrado). Além disso, as subunidades beta e gama da proteína G_i ativam canais de potássio modulados por proteínas G, causando efluxo desse cátion.

Os receptores CB1 são encontrados principalmente nos terminais de neurônios centrais e periféricos (Howlett, 2002e; Szabo e Schlicker, 2005). Eles são encontrados com alta densidade no cérebro, especialmente hipocampo e estriado, neocórtex, tronco encefálico, amígdala e hipotálamo (Howlett, 2002d; Matsuda et al., 1990c). A distribuição destes receptores pelo SNC é tal que sua ativação pode afetar vários processos como cognição, memória, função motora e nocicepção. Já o CB2 tem sua predominância no sistema imune e, quando ativado, pode modular migração de células imunes e liberação de citocinas fora e dentro do cérebro (Howlett, 2002c; Pertwee, 2005). Existem evidências da expressão do CB1 em células não neuronais, como células do sistema imune (Howlett, 2002b), e de receptores CB2 expressos por alguns neurônios dentro e fora do SNC (Gong *et al.*, 2006; Baek *et al.*, 2008).

O CB1 também pode ser encontrado fora do SNC, em tecidos periféricos como testículos, intestinos, bexiga e útero (Khanolkar *et al.*, 2000).

O receptor CB1 situado pré-sinápticamente pode modular ações de neurotransmissores, tais como a acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA) [responsável pelas terminações nervosas inibitórias], glutamato [terminações nervosas excitatórias] e D-aspartato e pensa-se estarem acoplados indiretamente com canais iônicos de cálcio, bem como canais iônicos de potássio (Figura 10).

Alguns polimorfismos no gene do CB1 e CB2 foram identificados e alguns desses foram relacionados com certas patologias, como esquizofrenia, depressão e

Doença de Parkinson. Foi identificada ainda uma relação com osteoporose pós-menopausa (Norrod e Puffenbarger, 2007; Bab *et al.*, 2009).

Desde a descoberta dos receptores CB1 e CB2 o interesse no desenvolvimento de fármacos que possam interagir com os receptores canabinoides vem aumentando. A atividade farmacológica de canabinoides psicotrópicos é significativamente influenciada pela sua estrutura química. Alguns canabinoides possuem centros quirais, portanto, exibem estereosseletividade (Howlett, 2002a).

1.4.2 Endocanabinoides

A sinalização dos endocanabinoides participam de uma gama de processos biológicos como memória, ansiedade, cognição, comportamento motor, nocicepção e apetite. Muitas condições patológicas envolvem direta ou indiretamente mudanças no sistema endocanabinoide, tornando-o assim atrativo para desenvolvimento de novas terapias (Svizenska *et al.*, 2008; Chahl, 2011)

Devane e colaboradores (1992) descreveram o isolamento de uma substância lipídica do cérebro que se liga ao receptor canabinoide, mimetizando as ações comportamentais do Δ^9 -THC quando injetado em roedores. Essa substância foi caracterizada como a araquidonoiletanolamida e a nomearam anandamida (AEA) (nome que vem do sânscrito e significa "prazer supremo"). Logo depois, dois grupos identificaram independentemente um novo endocanabinoide, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Vários outros endocanabinoides foram descritos em seguida como o éter Noladin (Hanus *et al.*, 2001), O-araquidonoiletanolamina (virodhamine) (Porter *et al.*, 2002) e a N-araquidonoildopamina (Huang *et al.*, 2002) mostrados na figura 11.

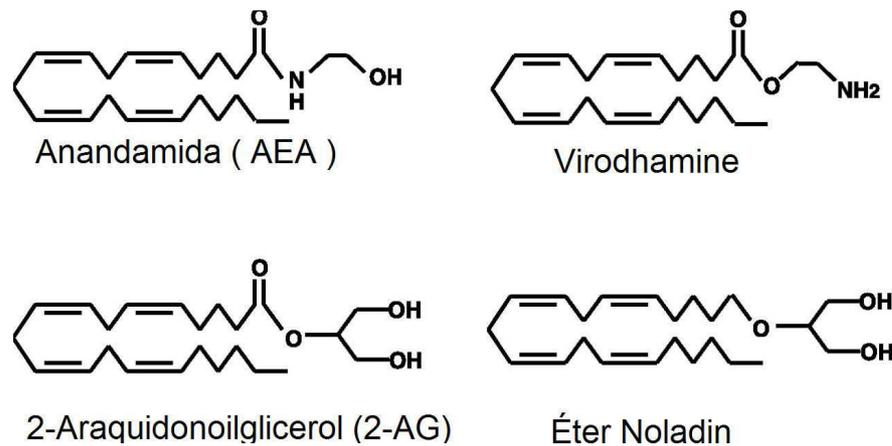


Figura 8: Endocanabinóides

A hidrolase das amidas de ácidos graxos (FAAH) é a principal enzima do catabolismo das amidas de ácido graxos incluindo a AEA e a *N*-palmitoiletanolamina (PEA) (Fezza *et al.*, 2008). Embora a PEA não se ligue aos receptores canabinoides, ela recentemente foi descrita como um ligantes endógeno para o receptor- α de proliferação dos perixissomo (PPAR- α) (Lo *et al.*, 2005). A PEA pode indiretamente alterar os níveis de endocanabinoides, competindo com a AEA e outras amidas de ácidos graxos pela degradação pela FAAH ou por suprimir a expressão da FAAH a nível transcricional (Bisogno *et al.*, 2002; Re *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, o TRPV1 também pode ser ativado pela AEA (Zygmunt *et al.*, 1999). A anandamida ativa esse canal com potência e eficácia menores do que as exibidas no CB1, mas que aumenta em certas condições patológicas como na inflamação, condição que altera a expressão do TRPV1 em tecidos e sua sensibilidade aos agonistas (Starowicz *et al.*, 2007).

A hemopressina (PVNFKFLSH), que é um nonapeptídeo derivado da cadeia α da hemoglobina, foi isolada originalmente a partir de homogeneizado de cérebro de rato como substrato de algumas enzimas como a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Rioli *et al.*, 2003a). Ela foi descrita como sendo responsável por uma resposta hipotensora branda, mas dose-dependente em camundongos, ratos e coelhos (Rioli *et al.*, 2003b; Blais *et al.*, 2005). Estudos posteriores indicaram que sua administração *in vivo* causa uma resposta antinociceptiva não opioide significativa em ratos (Dale *et al.*, 2005). O alvo celular foi identificado mais tarde como sendo o receptor canabinoide CB1 e ensaios *in vitro* revelaram a

hemopressina como sendo um agonista inverso seletivo do CB1 (Heimann et al., 2007b). O peptídeo apresentou uma afinidade nos ensaios de *binding* no CB1 similar ao rimonabanto (Heimann et al., 2007a) (Figura 12). O ensaio de *docking* sugeriu que a hemopressina se liga ao mesmo sítio que o rimonabanto (Scrima et al., 2010). Posteriormente verificou-se que a hemopressina inibe o apetite via CB1 em animais normais e obesos sem causar os efeitos adversos de náusea e sedação (Dodd et al., 2010). A hemopressina se comporta como um peptídeo neuromodulador endógeno com atividade em CB1, que possuem ações distintas na cascata de sinalização do CB1 frente aos agonistas clássicos, nos quais podemos salientar que o nível e a taxa de aumento da fosforilação da ERK1/2 pelo peptídeo é diferente de agonistas como Hu-210. Os níveis de aumento do Ca^{+2} intracelular são bem maiores que os induzidos pelo Hu-210. Os efeitos na sinalização pela hemopressina é parcialmente bloqueada pela toxina pertússica (PTX), enquanto é completamente bloqueada quando o Hu-210 é usado (Gomes et al., 2009).

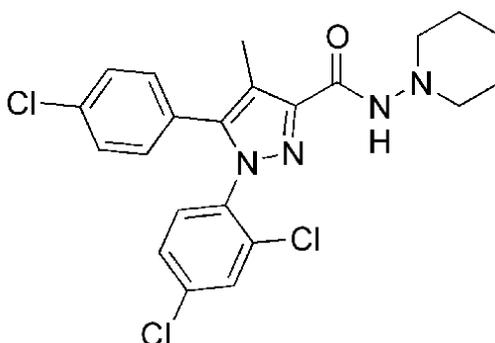


Figura 9: Estrutura química do rimonabanto

O rimonabanto é um agonista inverso sintético capaz de provocar redução de peso por longo período em roedores e em humanos (Van Gaal et al., 2005; Di Marzo, 2008) mas que causava efeitos adversos centrais importantes descritos acima (Christensen et al., 2007). Por causa desses efeitos, o rimonabanto (Acomplia®; SR141716) foi retirado do mercado pelas agências europeias. Hoje busca-se um antagonista seletivo de CB1 capaz de manter os benefícios terapêuticos sem os efeitos adversos do rimonabanto.

1.5 N-acilidrazonas do LASSBio

Nosso grupo, juntamente com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), caracterizou o composto LASSBio-881 (Figura 13) como um novo antagonista TRPV1 e agonista inverso CB1, que possui propriedades antinociceptivas (Tributino et al., 2010b).

O LASSBio-881 é um dos derivados do composto protótipo LASSBio-294 (Figura 13), sendo ambos 3,4-metilenodioxifenil-N-acilidrazonas. O LASSBio-881 foi desenhado através do planejamento racional de candidatos a fármacos, via hibridação de componentes estruturais da nimesulida com o LASSBio-294, com intenção de aumentar o efeito anti-inflamatório do último.

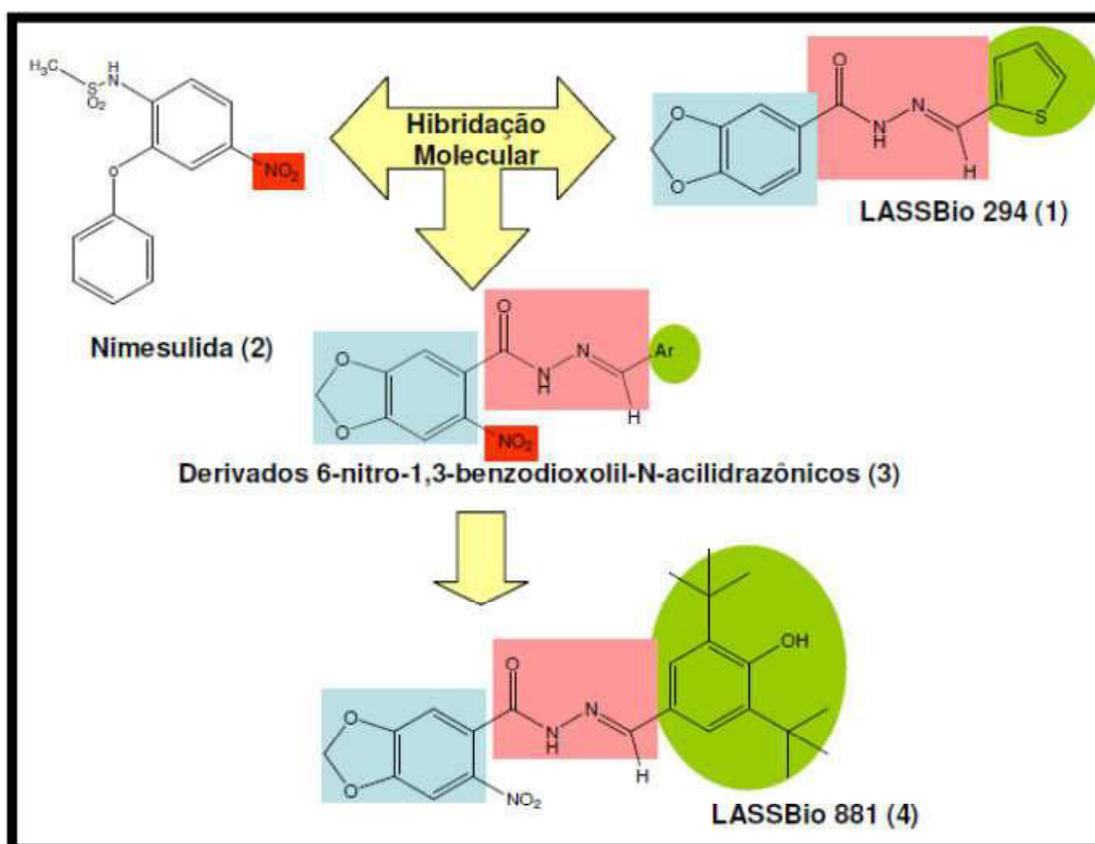


Figura 10: Síntese do derivado 6-nitro-1,3-benzodioxolil-N-acilidrazônicos do composto LASSBio 294, (1), de onde foi originário o composto LASSBio 881 (4). (Tributino, 2008)

Interessantemente, o LASSBio-294, em estudos ainda não publicados, apresenta-se como agonista parcial do TRPV1. Além disso, o LASSBio-294 parece competir com a capsaicina no TRPV1, antagonizando os efeitos da mesma. Ou seja, as modificações feitas na molécula para produzir o LASSBio-881 fizeram com que

este deixasse de ser capaz de ativar o receptor em altas concentrações e passasse a apenas antagonizá-lo.

Essa diferença entre o LASSBio-294 e o 881 suscitou a pergunta de quais seriam os requisitos estruturais para as determinadas ações TRPV1 e CB1. Tendo acesso, através da colaboração com o LASSBio, a uma quimioteca do mesmo, buscou-se moléculas com modificações pontuais para mapear a importância de cada grupamento funcional. Todas as moléculas estudadas no presente projeto possuem ainda em sua estrutura uma benzodioxola, que ocorre também, interessante, na piperina, um outro agonista TRPV1.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O projeto tem como objetivo principal a caracterização de requisitos moleculares responsáveis pelas atividades agonista e antagonista de *N*-acilidrazonas no TRPV1 e CB1. Para tal, investigaremos as ações de uma série de *N*-acilidrazonas sintetizados pelo LASSBio em testes padronizados de ativação ou inibição dos receptores TRPV1 e CB1, expressos em ovócitos de *Xenopus* e neurônios sensoriais.

2.2. Objetivos Específicos

- ➔ Utilizar os compostos 123, 294, 881, 882, 897 e 945 (Figura 14) para realizar ensaios eletrofisiológicos em ovócitos de *Xenopus* expressando receptores CB1 ou TRPV1 ou em neurônios sensoriais visando a ação no TRPV1.
- ➔ Para estudar o TRPV1 utilizaremos os compostos acima na presença ou não de estímulos como a capsaicina e o pH ácido.
- ➔ No caso do CB1, os compostos serão testados sozinhos ou frente a estímulos com WIN 55212-2.

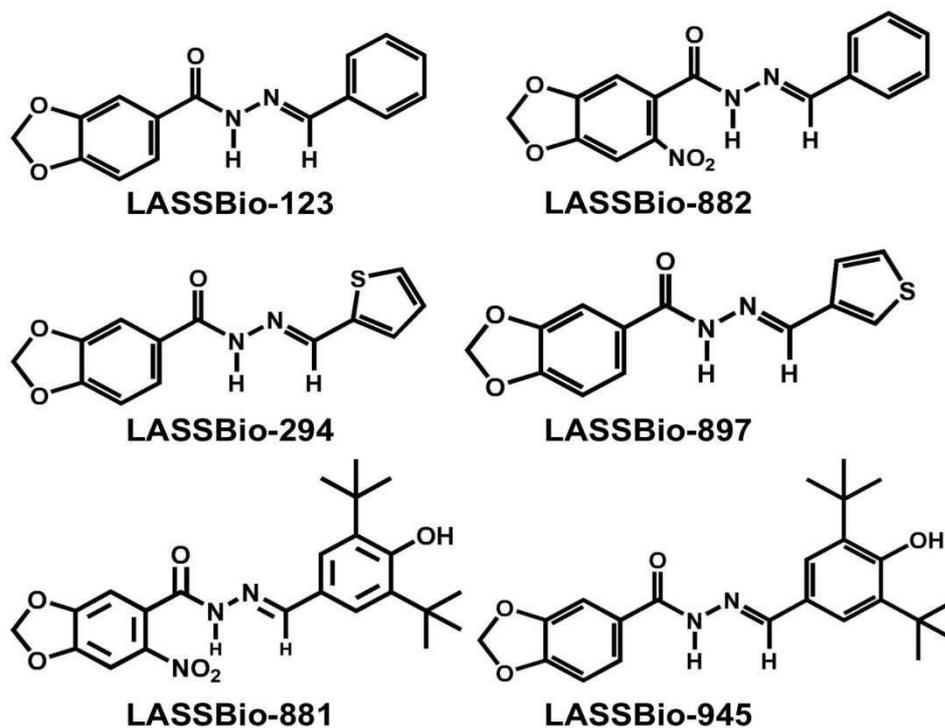


Figura 11: Substâncias do LASSBio usadas no presente projeto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções

3.1.1 Eletrofisiologia

Solução de tricaína – preparada no momento de uso com 0,75 g/L de tricaína (Western Chemical) com 3 g/L de bicarbonato de sódio.

Solução salina para colagenase - em mM: 96 NaCl; 2 KCl; 5 MgCl₂; 5 HEPES) em pH 7,6.

Solução de Colagenase - colagenase tipo 1, 0,8 mg/mL (Sigma) na solução citada acima.

Solução de Barth - em mM: 88 NaCl; 1 KCl; 0,91 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 HEPES; 24 NaHCO₃; 0,33 Ca(NO₃)₂ em pH 7,6.

Solução ND 96 - em mM: 96 NaCl; 2 KCl; 1,8 CaCl₂; 1 MgCl₂; 5 HEPES em pH 7,6.

Solução KIR - em mM: 20 NaCl; 70 KCl; 2 MgCl₂; 5 HEPES em pH 7,6.

Solução pH 5.5 - em mM: 96 NaCl; 2 KCl; 1 MgCl₂; 0,1 CaCl₂; 5 acetato de sódio.

LASSBIO – Todos os análogos testados eram solubilizados em DMSO (solução estoque 10 mM) e diluídos a 20µM em ND 96.

Capsaicina (Cayman Chemical) – Solução estoque feita com etanol a 10mM e diluída para 1µM com ND 96.

WIN 55.212-2 (Enzo life science) - Solução estoque feita com DMSO a 10mM e diluída para 500nM com ND 96.

3.1.2 Células HEK 293

Meio MEM HEK completo - 90 mL de MEM (Gibco), 10 % de soro fetal bovino (JRH Bioscience), 2,9 mL de NaHCO₃ 7,5 %, 1 mL de glutamina (100nM) (Gibco) e 1 mL de Penicilina/Estreptomicina (ambas da Sigma e a 10000 U/mL e a 10 mg/mL, respectivamente).

Meio MEM para transfecção - 90 mL de MEM, 2,9 mL de NaHCO₃ 7,5 %, 1 mL de glutamina , qsp 100 mL.

Solução de Fluorímetro - 145 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 10 mM HEPES em pH 7,4.

Fura-2 (Invitrogen) – estoque a 4µM em DMSO.

Fluo-4 (Invitrogen) – estoque a 4 μ M em DMSO.

Pluronic F-127 - 0,04% de ácido plurônico (de um estoque de 20% em DMSO – Molecular Probes).

Ionomicina (Invitrogen) - a 4 μ M, estoque a 1 mM em DMSO.

LASSBIO – Todos os análogos testados eram solubilizados em DMSO (solução estoque 10 mM) e diluídos a 20 μ M em solução de fluorímetro.

Capsaicina (Cayman Chemical) – Solução estoque feita com etanol a 10mM e diluída para 1 μ M em solução de fluorímetro.

3.1.3 Gânglio da Raiz Dorsal (DRG)

Meio DMEM F12 (Gibco)

Solução de Krebs - 132 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,4 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 6 mM glicose, 10 mM HEPES, pH 7,4.

LASSBIO – Todos os análogos testados eram solubilizados em DMSO (solução estoque 10 mM) e diluídos a 20 μ M em solução de Krebs.

Capsaicina (Cayman Chemical) – Solução estoque feita com etanol a 10mM e diluída para 1 μ M em solução de Krebs.

3.2. Eletrofisiologia

3.2.1 Obtenção dos Ovócitos de *Xenopus laevis*

O protocolo experimental envolvendo animais tem aprovação do CEUA sob o número DFBC009. Para a preparação, foram utilizadas fêmeas adultas de *Xenopus laevis* que foram mantidas em ciclos de 12-12h claro/escuro. Antes das cirurgias elas foram acondicionadas em um recipiente com solução de triclaína para serem anestesiadas. Depois de aproximadamente meia hora – após efeito da anestesia – foi removido cirurgicamente um pedaço do ovário contendo os ovócitos. Em seguida foram mantidos em solução salina para colagenase.

Os ovócitos retirados foram tratados com colagenase, por dois períodos de 45 minutos cada (havendo troca da solução de colagenase no meio). Em seguida, foram realizadas lavagens em solução para colagenase, Barth e de ND-96. Após essas lavagens, foram mantidos em solução salina de ND-96 complementado com 40 mg/mL de gentamicina, para evitar contaminação.

3.2.2. Injeção de cRNA

Os ovócitos foram então injetados usando um microinjetor com aproximadamente 2,0 ng num volume de 50 nL de cRNA codificando TRPV1 de rato ou CB1 de camundongo, este último acrescido das subunidades Girk e Cir do canal de potássio ativado por proteína G. Os RNAs injetados foram transcritos *in vitro* conforme protocolo do fabricante (Ambion).

Após a injeção, os ovócitos foram mantidos em placas de 96 poços (um em cada) com ND-96 complementado com gentamicina até o registro (aproximadamente 7 dias).

3.2.3. Registro Eletrofisiológico com Ovócitos

Para o registro, os ovócitos foram colocados em um poço e continuamente perfundidos com ND-96 a aproximadamente 1 mL/min. Nos registros com o TRPV1,

como estímulo de prótons, foi usada uma solução com pH 5,5. Nos outros casos, o próprio ND-96 foi utilizado. Já para o CB1, a solução utilizada foi de alto potássio, denominada KIR. Os registros utilizando dois eletrodos foram realizados com voltagem fixa em -60 mV para TRPV1 e -70mV para CB1, à temperatura ambiente (21-23°C).

Os registros foram obtidos usando um amplificador GeneClamp 500, digitalizados pelo conversor MacLab A/D e analisados com o programa Chart. Os eletrodos de vidro foram feitos em um puxador horizontal (P-97, Sutter), preenchidos com KCl 3 M, devendo alcançar uma resistência final de 0,4-0,8 MOhms. As correntes foram digitalizadas a 100 Hz e filtradas digitalmente a 2 Hz. Os ovócitos foram descartados quando o potencial transmembranar estava acima de -10 mV, ou quando a corrente basal estava instável ou superior a -500 mA. As soluções que banham os ovócitos foram trocadas durante o registro por um controlador de válvulas (AutoMate Scientific Inc.), e geralmente aplicadas em pulsos de 45 segundos.

Os estoques das substâncias para os registros foram feitos em etanol ou DMSO e diluídos em ND-96 pH 7,6 logo antes dos experimentos (ou KIR, no caso do CB1).

3.2.4. Análise dos resultados

Os registros foram obtidos no programa Chart, como mencionado, e após redução digital do ruído, a amplitude das correntes foi determinada no próprio programa. Em cada ovócito foi feito um estímulo máximo ao final do registro, com os agonistas capsaicina ou WIN 55212-2, para obtenção de 100% da atividade. Os resultados foram expressos então em porcentagem do efeito máximo.

Os dados foram utilizados então no programa Prism para obtenção dos gráficos e também da análise estatística. As barras representam as médias e o erro padrão das médias, e o n está mencionado na legenda de cada figura. Para análise estatística foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey's. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

3.3. Transfecção de Células HEK 293

3.3.1 – Cultura de HEK 293

As células foram cultivadas em garrafas de 45 mL com 5 mL de meio MEM completo. Este meio é chamado de meio completo para HEK (pois contém o soro fetal bovino e antibióticos).

3.3.2 - Plaqueamento

O meio foi retirado da garrafa de 45 mL, e foram adicionados 2 mL de tripsina (Cultilab) a 0,25% e, após aproximadamente 40 segundos de contato, a tripsina foi retirada utilizando-se uma pipeta. Adicionou-se então 5 mL de meio MEM para plaqueamento, meio esse que possui a mesma composição do completo exceto pelo antibiótico que fica ausente no meio de plaqueamento. Fez-se então movimentos de jateamento com a pipeta e o meio para retirar as células aderidas no fundo da garrafa.

Após contagem de células em câmara de Neubauer, plaqueou-se a quantidade necessária para obter uma densidade de 100.000 células/cm² em placas de 6 poços, que foram então mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂.

3.3.3 Transfecção

Para cada poço da placa (P6) usou-se 500 µL de meio para transfecção contendo 1 µg do plasmídeo (DNA) a ser utilizado. Do volume total de meio para transfecção a ser usado, separou-se o total em 2 tubos, sendo que no primeiro adicionou-se o volume de DNA calculado previamente levando em conta o número de poços a serem transfectados e a concentração do DNA. No segundo tubo adicionou-se a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) na proporção de 2,5 µL de Lipofectamina 2000 para cada 1 µg de DNA. Esperou-se 5 minutos e o conteúdo dos 2 tubos foi agrupado em um só. Após 20 minutos, 500 µL da mistura final foram adicionados em cada poço da placa, sendo que o meio existente em cada poço era retirado previamente. As células foram incubadas com a solução de transfecção em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 4 horas.

Ao final das 4 horas adicionou-se 1,5 mL de meio completo em cada poço e as placas podiam ser utilizadas para experimentos no dia seguinte. Um poço permanecia sem transfecção para servir como controle.

3.3.4. Replaqueamento

No dia seguinte, uma placa de 96 poços foi preparada, visando a leitura na Flexstation da seguinte maneira: as células transfectadas foram descoladas da placa original apenas por aspiração com uma pipeta P1000. Foi realizada uma leitura na câmara de Neubauer para cálculo do volume necessário para obter 200.000 células/poço, num volume de 150 μ L. O mesmo procedimento foi realizado para as células sem transfecção.

3.3.5. Solução de Azul de Tripán

Uma vez que o fluoróforo Fluo-4 torna-se fluorescente mesmo em contato com o cálcio extracelular, foi usado o Azul de Tripán (Sigma) a 0,1% na solução de Fluorímetro. O papel do azul de Tripán, que não entra na célula saudável, foi de fazer o *quenching* da fluorescência extracelular. Todos os reagentes foram preparados usando essa solução.

3.3.6. Os corantes de cálcio

O carregamento foi realizado usando um dos fluoróforos (Fluo-4 ou Fura-2). Além do fluoróforo, a solução de carregamento continha 0,04% de ácido plurônico e a mistura foi sonicada por 3 minutos antes do uso.

O meio da placa de 96 poços foram retirado por sucção branda e em cada poço eram adicionados 40 μ L de solução de carregamento. A placa foi embrulhada em papel alumínio para evitar a ação da luz e colocada na estufa 5% CO₂ por 45 minutos. Ao término desse tempo a placa era retirada da estufa e eram adicionados 100 μ L por poço dos LASSBios desejados. Nos poços onde os LASSBios não eram testados (controle) usava-se somente 100 μ L da solução de azul de tripan.

Foram testados após 30 minutos na Flexstation 3 (Flexstation 3 Benchtop Multi-Mode Microplate Reader- Molecular Devices). O controle positivo do carregamento era feito com a ionomicina a 4 μ M, adicionada ao fim do experimento.

Os estoques das substâncias para os registros foram feitos em etanol ou DMSO e diluídos em solução de fluorímetro pH 7,4 logo antes dos experimentos.

3.3.7 – Análise de resultados

Os dados foram analisados nos softwares Softmax Pro 5.4 e no GraphPad Prism 5, submetidos a regressão não linear e ajustados usando uma fórmula convencional de curva dose-resposta do Prism.

3.4 Cultura de Gânglio da Raiz Dorsal (DRG)

3.4.1 – Preparo prévio das lamínulas

As lamínulas de 15 mm (Knittel Deckglasser) foram tratadas com poli-lisina (40 µg/mL) e incubadas na estufa a 37°C com 5% CO₂. No dia da cultura, foram adicionados 20 µL de laminina (20 µg/mL de meio DMEM F12) no centro de cada lamínula, que foram incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂ para polimerizar.

3.4.2. Cultura de DRG

As culturas de DRGs foram realizadas em colaboração com o laboratório de neuroquímica do Instituto de biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ sobre a supervisão do professor Ricardo de Melo Reis. Usou-se camundongos C57Bl/6 neonatos (P0-P2). Os animais foram decapitados e tiveram o tórax e abdômen abertos até se alcançar a coluna vertebral, procedimento realizado em placa de petri contendo o meio DMEM F12 (com 10% de soro fetal bovino) filtrado previamente. Fez-se um corte coronal no meio da coluna vertebral para ter acesso aos gânglios. Retirou-se os gânglios colocando-os em placa com meio DMEM F12, e na sequência retirou-se os axônios dos gânglios.

Os gânglios foram tripsinizados em volume de 2 mL (TryPle - Gibco) num tubo cônico por 10 min a 37°C. Retirou-se o excesso de tripsina e lavou-se com 15 µL de solução 0,1% de DNase tipo II (Sigma). Foi adicionado 1 mL de meio para neutralizar a tripsina e iniciou-se a dissociação mecânica. Centrifugou-se a mistura por 2 min em baixa rotação, e em seguida aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio sem soro. Essa suspensão de células foi

adicionada numa coluna de vidro (bureta) que continha meio DMEM F12 com soro (previamente preparada na noite anterior e deixada na geladeira a 4°C) que, por diferença de viscosidade, cria um gradiente de decantação. Após 45 min na coluna, separou-se o eluido em 12 tubos de 5 mL. Ao microscópio ótico selecionou-se as frações ricas em corpos celulares, que foram então agrupadas e centrifugadas por 5 min novamente. O sobrenadante foi novamente retirado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM F12, e então foram transferidas para um microtubo. As células foram novamente centrifugadas na rotação de 4000 rotações por minuto por 5 min na microcentrífuga. O meio no sobrenadante foi substituído por um contendo 100 ng/mL NGF e as células foram ressuspensas. Plaqueou-se 20 µL da solução de células em cada lamínula, bem no centro da mesma.

No dia do experimento, as células foram carregadas por 45 minutos com 4 µM Fura-2/AM (Molecular Probes), meio DMEM F12 com 10% de soro fetal bovino e 0,02% de Pluronic F-127® (Molecular Probes), incubadas em estufa com 5% CO₂ e à temperatura de 37°C. Após o carregamento, as lamínulas foram montadas na câmara RC-20 sobre a plataforma P-5 (Warner Instruments, Hamden, CT) na mesa do microscópio invertido de fluorescência (Eclipse Ti-U; Nikon). As células foram perfundidas continuamente por solução de Krebs e estimuladas com diferentes soluções (CAP, compostos do LASSBio, RR), conforme descrito abaixo. As soluções eram adicionadas as células por um sistema de perfusão gravitacional, composto por várias seringas e uma válvula de seletor rotatório. O incremento do [Ca²⁺]_i era avaliado em intervalos de 500 milissegundos para quantificar a fluorescência emitida a 510 nm após excitação alternada a 340 e 380 nm, usando um sistema de iluminação Lambda DG4 (Sutter Instrument, Novato, CA), que era captada por uma câmara digital de alta sensibilidade Photometrics Evolve 512 (Photometrics, Tucson, AZ). Os valores lidos foram processados usando o software Metafluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Após a escolha do campo na lamínula ao microscópio de fluorescência, usou-se a solução de Krebs para lavá-las, e todas as outras substâncias que foram testadas foram preparadas usando a solução de Krebs como diluente. Sempre iniciávamos os experimentos com um pulso de capsaicina (CAP), seguido da solução de lavagem e então aplicávamos os compostos e depois o mesmo

juntamente com a capsaicina. Também foram realizados experimentos com duplo pulso de capsaicina e de antagonismo dos receptores TRPV1 com vermelho de rutênio (RR). Nesse caso, aplicou-se primeiro a CAP e em seguida o RR e subsequentemente RR com CAP.

Os estoques das substâncias para os registros foram feitos em etanol ou DMSO e diluídos em solução de Krebs pH 7,4 logo antes dos experimentos.

3.4.3 – Análise de resultados

Os dados foram analisados nos softwares GraphPad Prism 5 e no Clampfit 9.2, obtendo-se os valores de pico subtraídos dos valores basais (Clampfit) e utilizando esses valores para obter a porcentagem de ativação relativa à primeira aplicação de capsaicina (100%).

4. RESULTADOS

4.1 Eletrofisiologia

Inicialmente foram realizados os experimentos eletrofisiológicos do receptor TRPV1 expresso nos ovócitos. A figura 15 mostra um registro típico, em que ao aplicarmos a capsaicina, é provocada uma deflexão para baixo da linha de base, indicativa de corrente negativa, ou provocada pela entrada de cátions (no caso).

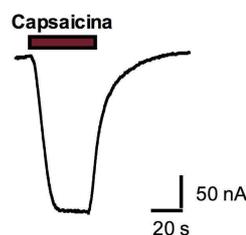


Figura 12: Corrente típica em ovócito expressando receptores TRPV1 com a aplicação de capsaicina a 1 μ M.

Numa primeira avaliação, foram realizados registros eletrofisiológicos do TRPV1 na presença dos LASSBios, a 20 μM cada, aplicados sozinhos. No gráfico, as respostas obtidas são comparadas às da capsaicina sozinha a 1 μM (Figura 15). Essa série de substâncias apresenta grande lipossolubilidade (log P estimado de 2,22 a 5,37), o que dificultou a dissolução de algumas delas (Munaro-Vieira, 2012). Entretanto, para o LASSBio-294 foi possível realizar uma curva concentração-resposta, embora fixando-se o máximo de atividade 'artificialmente' como igual ao da capsaicina, conforme mostrado na figura 17. Notamos que a atividade agonista aumenta com a concentração do LASSBio-294, até a concentração máxima obtida (250 μM). Mesmo assim a atividade do LASSBio-294 não chega a 50% da ativação promovida pela capsaicina.

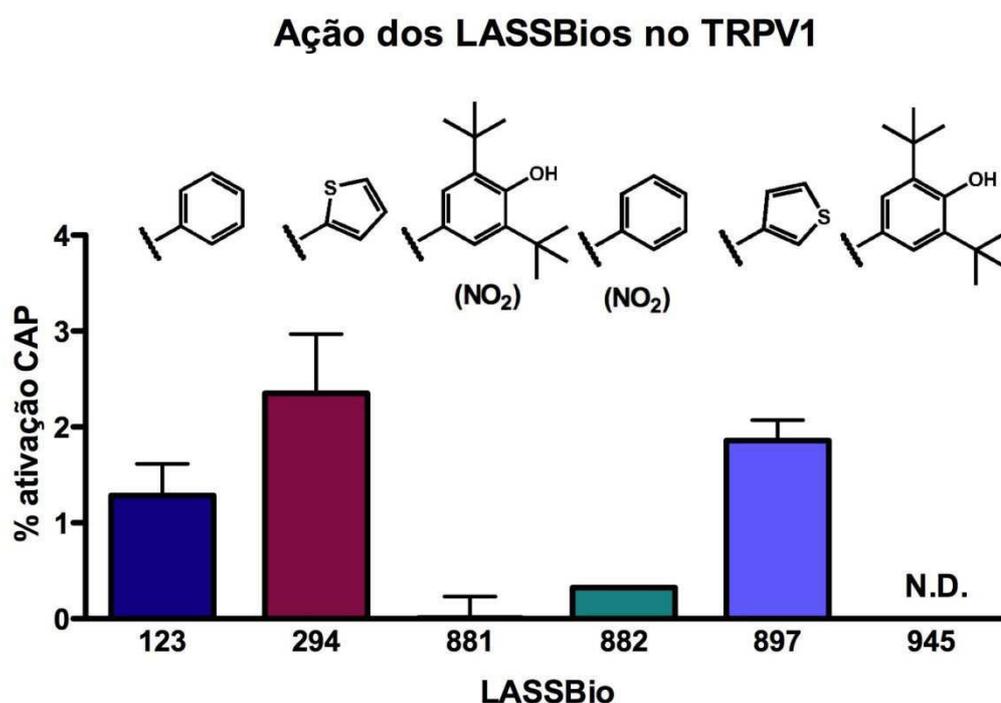


Figura 13: LASSBios como agonistas de baixa eficácia do TRPV1 em pH 7,6. Utilizando-se como parâmetro a capsaicina 1 μM (100%), observa-se que os LASSBios a 20 μM não chegam nem a 3% da atividade registrada com capsaicina. N.D. Não determinado. Todos os grupos testados foram estatisticamente diferentes da capsaicina ($P < 0,001$, $n = 2-8$ ovócitos).

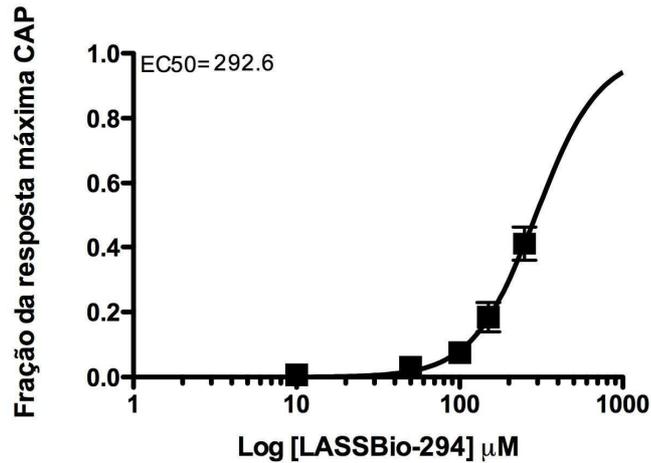


Figura 14: Curva CR do LASSBio-294 como agonista do TRPV1. Normalizada pela corrente máxima de capsaicina. A curva e EC50 foram obtidos fixando-se o máximo de atividade em 100% (n=4-8 ovócitos).

Pôde-se notar na Figura 16, que as substâncias-teste não se mostraram como agonistas de alta eficácia intrínseca na concentração testada para o TRPV1 no pH 7,6, atingindo no máximo aproximadamente 2,5% do efeito da capsaicina, na concentração de 20 μm mencionada. Nos perguntamos então se essas ações muito discretas de algumas das substâncias testadas poderiam ser exacerbada se coaplicadas com pH ácido (5,5). De fato, notou-se mudanças importantes para algumas das substâncias (Figura 18). No gráfico, a resposta ao pH 5,5 somente está comparada às das substâncias no mesmo pH, sendo que o pH 5,5 evoca uma resposta de aproximadamente 20% da resposta da capsaicina a 1 μm (não mostrado). Algumas das substâncias provocaram um grande aumento da corrente quando comparadas à de pH apenas, destacando-se o LASSBio-123 que teve uma corrente nove vezes maior do que a proporcionada somente pelo pH. Além do 123, os LASSBio-294 e 897 também pareceram exibir cooperação com o pH na ativação do TRPV1, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. O LASSBio-881, como já descrito, teve o efeito oposto, antagonizando a ação do pH (Tributino et al., 2010d).

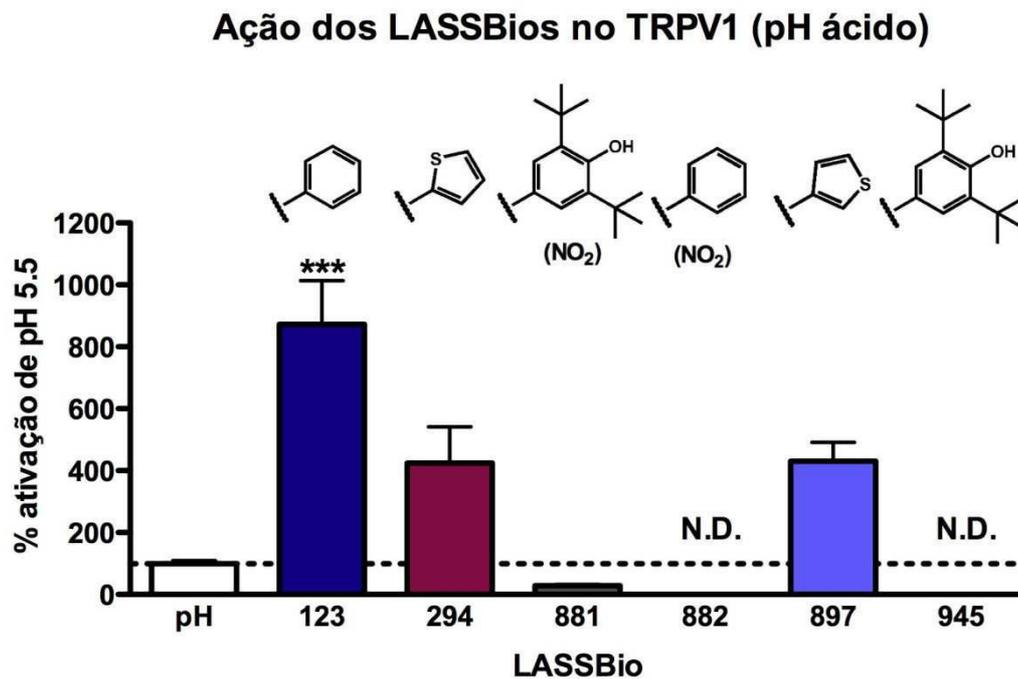


Figura 15: LASSBios co-aplicados com solução pH 5,5 no TRPV1. Utilizou-se como parâmetro a ativação do pH 5,5, que é cerca de 20% da de capsaicina 1 μ M. Aplicando-se as substâncias a 20 μ M ocorre maior ativação do TRPV1 em alguns casos. N.D. Não determinado. *** $P < 0,001$, $n = 2-9$ ovócitos.

Após testar o possível efeito agonista das substâncias no TRPV1 em pH fisiológico e ácido, nos perguntamos então como seriam na atividade antagonista da capsaicina, efeito já descrito para o LASSBio-881. Para tal ensaio, utilizou-se novamente as substâncias a 20 μ M e a capsaicina a 1 μ M, mas dessa vez coaplicados após 30 segundos de incubação com as substâncias sozinhas. Na figura 19 observa-se o efeito dessa coaplicação comparando-se à capsaicina sozinha, onde nota-se que, afora o LASSBio-881, apenas o LASSBio-294 apresentou antagonismo.

Ação dos LASSBios no TRPV1 na presença de capsaicina

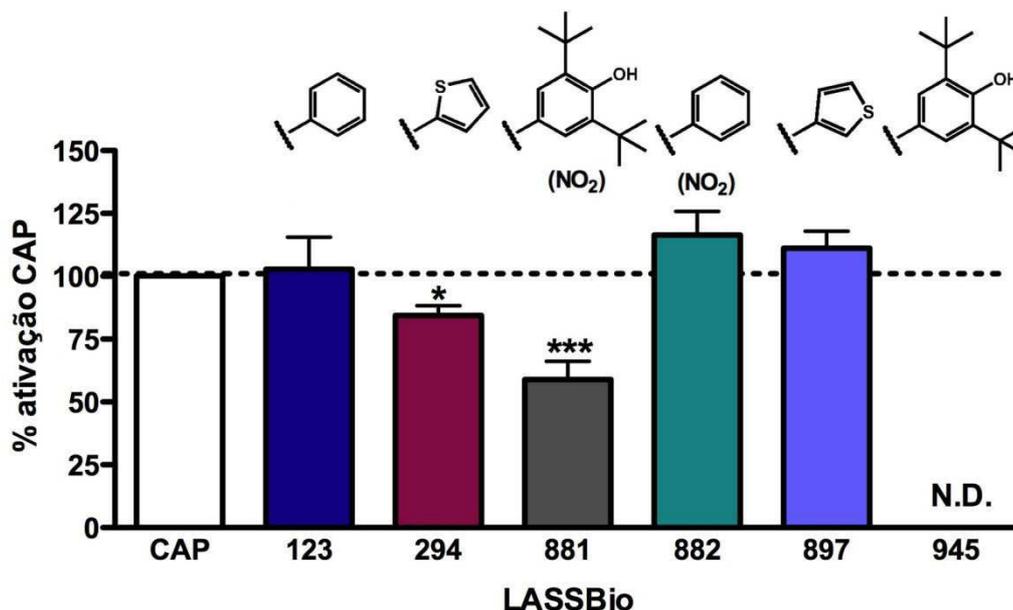


Figura 16: LASSBios como antagonistas do TRPV1 em pH 7.6. Utilizando-se como parâmetro a capsaicina 1 μM e LASSBios a 20 μM . Somente os LASSBios 294 e 881 conseguem antagonizar a ação da capsaicina. N.D. Não determinado. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, $n = 3-8$ ovócitos.

Como mencionado na introdução, muitas substâncias têm ação conjunta no TRPV1 e no CB1, portanto há requisitos estruturais em comum para as ações nesses receptores. Dentro do grupo do presente estudo, temos o LASSBio-881, que é um antagonista TRPV1 e agonista inverso CB1 (Tributino et al., 2010a). Conseqüentemente, gostaríamos de saber como se dão as ações dessas substâncias também no CB1.

Na figura 20 apresentamos os dados da aplicação dos compostos a 20 μM juntamente com WIN 55212-2 (WIN) a 500 nM, sempre comparando-se com o agonista sozinho. Novamente, como já mostrado em trabalhos ainda não publicados, o LASSBio-881 antagonizou o efeito do WIN em quase 80%. Interessantemente, o LASSBio-882 também inibiu a atividade do CB1 causada pelo WIN. O 123 apresentou uma inibição do WIN de 30%, mas não obteve significância estatística. Os demais derivados não tiveram atividade significativa.

Ação dos LASSBios no CB1

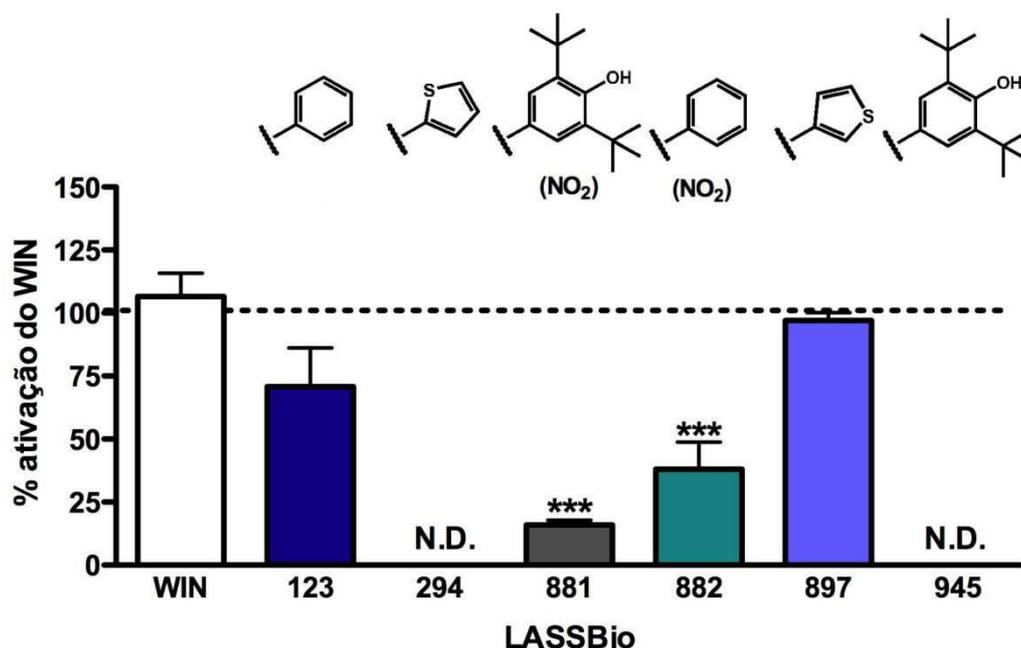


Figura 17: LASSBios como antagonistas do CB1. Utilizando-se como parâmetro o WIN 55212-2 a 500 nM, foram testados os LASSBios a 20 μ M junto com o WIN 55212-2. Aparentemente o LASSBio-881 e o LASSBio-882 foram capazes de antagonizar a ativação provocada pelo WIN 55212-2. N.D. Não determinado. *** $P < 0,001$, $n = 3-6$ ovócitos.

4.2 Atividade TRPV1 em células HEK transfectadas

A partir de meados de 2012, os ovócitos obtidos das rãs passaram a não exibir qualidade para realização de experimentos de eletrofisiologia, por isso buscou-se métodos alternativos.

Inicialmente, buscamos reproduzir os dados já publicados do antagonismo TRPV1 pelo LASSBio-881 realizados em ovócitos nos valendo de células HEK293 transfectadas transitoriamente com o TRPV1 de rato. Os ensaios foram realizados num leitor de placa automatizado, e consistiam na obtenção de curvas concentração-resposta da capsaicina com a presença ou não de 20 μ M do LASSBio-881 (Figura 21).

Com as curvas, obtivemos um EC_{50} para a capsaicina de 14 nM, valor bem abaixo do que é reportado (aproximadamente 300 nM) (Tributino et al., 2010c) (Figura 21). Também pudemos notar que a curva obtida na presença do LASSBio-881 foi praticamente idêntica à da capsaicina sozinha. Isso nos indicou que esse ensaio não era adequado para dar continuidade a esse estudo, possivelmente pela resposta à capsaicina ser muito potente nessas condições.

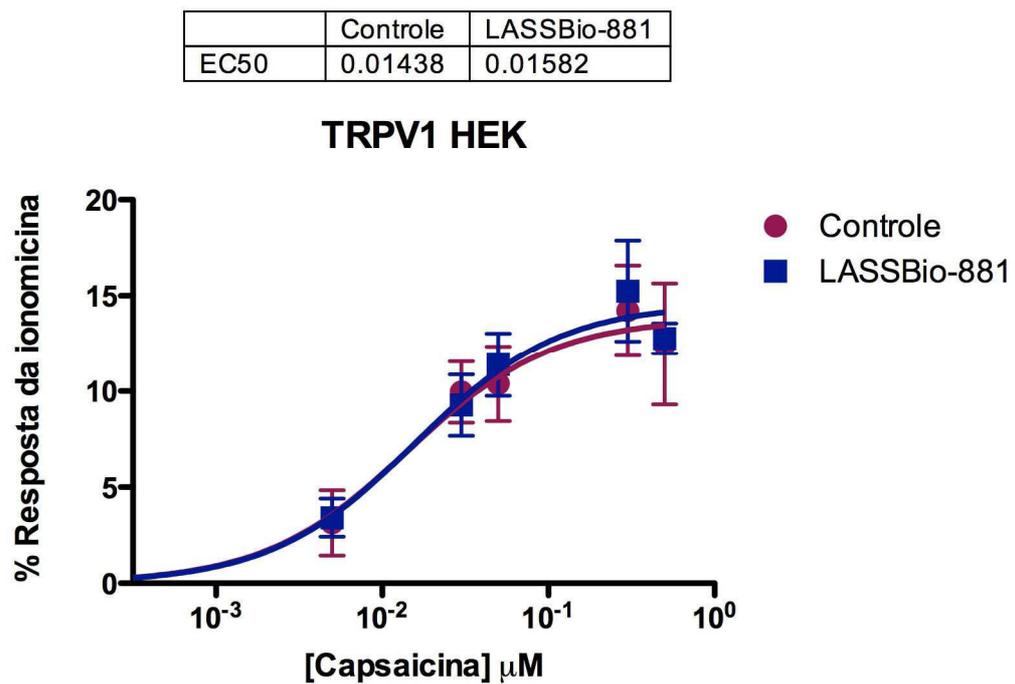


Figura 18: Curvas concentração resposta à capsaicina na presença ou não de 20 μ M de LASSBio-881 em células HEK293 transfectadas transitoriamente com o TRPV1 (n= 2 experimentos, cada um com triplicatas).

4.3 Análise das respostas de cálcio em neurônios sensoriais (DRG)

A hipótese que levantamos para explicar o insucesso com as células HEK foi a de que há super-expressão dos receptores, fazendo com que as respostas atinjam uma saturação facilmente, dificultando a inibição. Então nos perguntamos se utilizando células com TRPV1 nativo isso seria resolvido. Assim, utilizamos culturas de neurônios obtidos dos DRGs, os quais expressam TRPV1 naturalmente. Para tal

ensaio, utilizou-se novamente as substâncias do LASSBios a 20 μM e a capsaicina a 1 μM .

Inicialmente verificamos a resposta à capsaicina por essas células, em duas aplicações consecutivas. O intuito dessas aplicações consecutivas era determinar se na segunda observaríamos diminuição na resposta, já que essa segunda aplicação seria necessária para verificar a ação de supostos antagonistas. Na figura 22A pode-se observar que o segundo pico de fluorescência provocada pela capsaicina foi menor. Essa diferença foi quantificada, e estimada em cerca de 40% (Figura 22B).

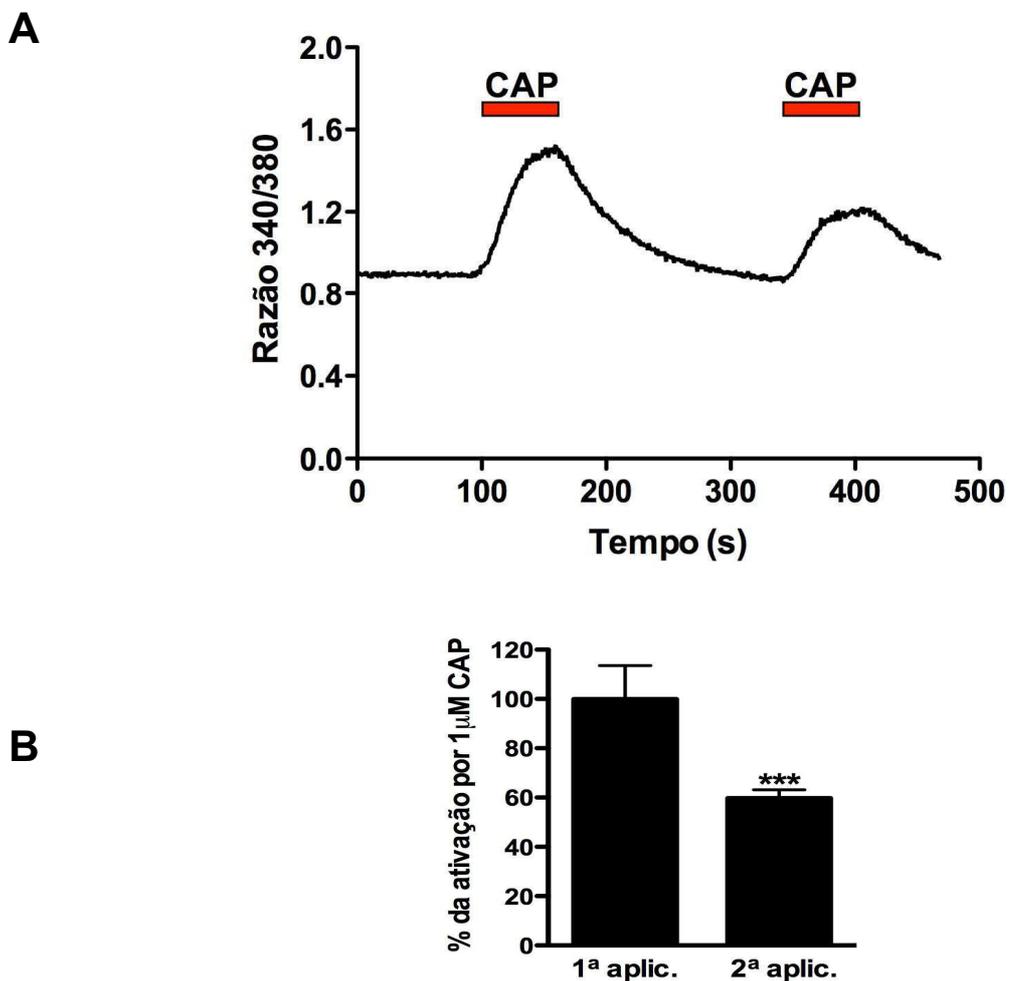


Figura 19: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a duas aplicações consecutivas à capsaicina 1 μM . B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 12$ células de 3 experimentos).

Em seguida nos certificamos de que as respostas à capsaicina deviam-se à ativação do TRPV1, utilizando o vermelho de rutênio (RR a 10 μ M) . Pode-se notar na figura 23A que o RR bloqueou inteiramente a resposta à capsaicina (quantificada na 23B).

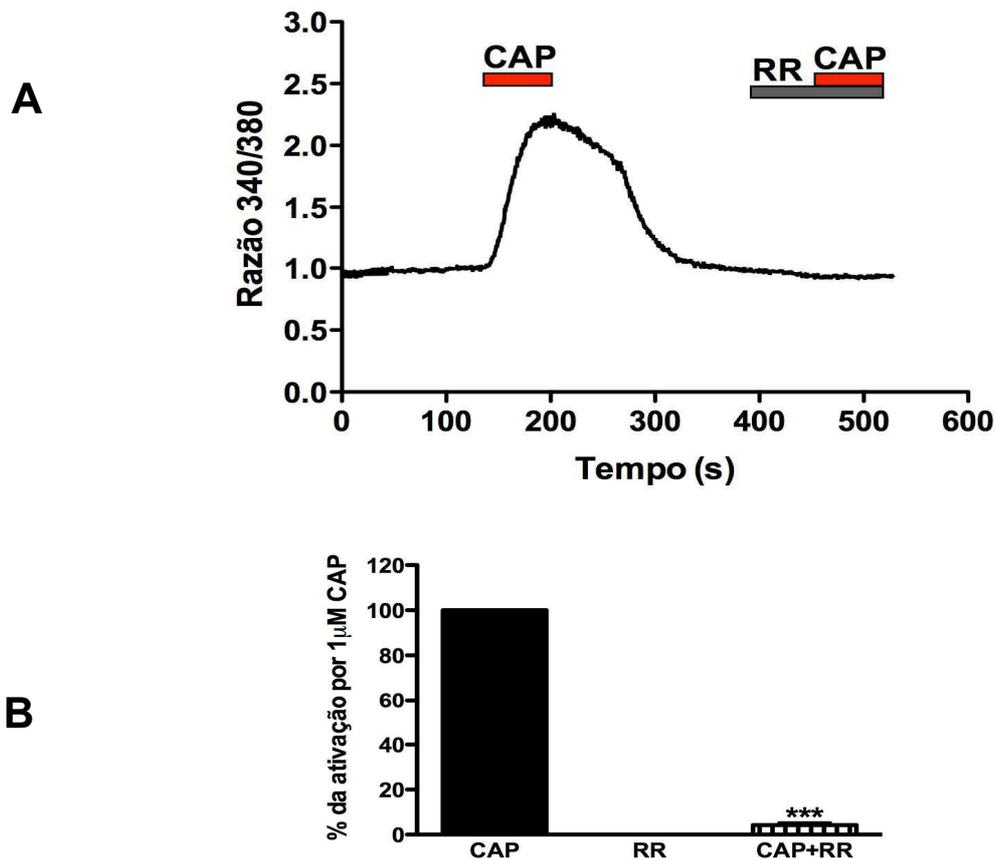


Figura 20: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μ M seguida de vermelho de rutênio (RR) e capsaicina com RR. B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 7$ células de 2 experimentos).

Feitos esses controles, pudemos checar se seria possível detectar nesse sistema o antagonismo já descrito para o LASSBio-881. Na figura 24A notamos que de fato a aplicação do LASSBio-881 juntamente com a capsaicina abole a resposta da mesma (Figura 24B).

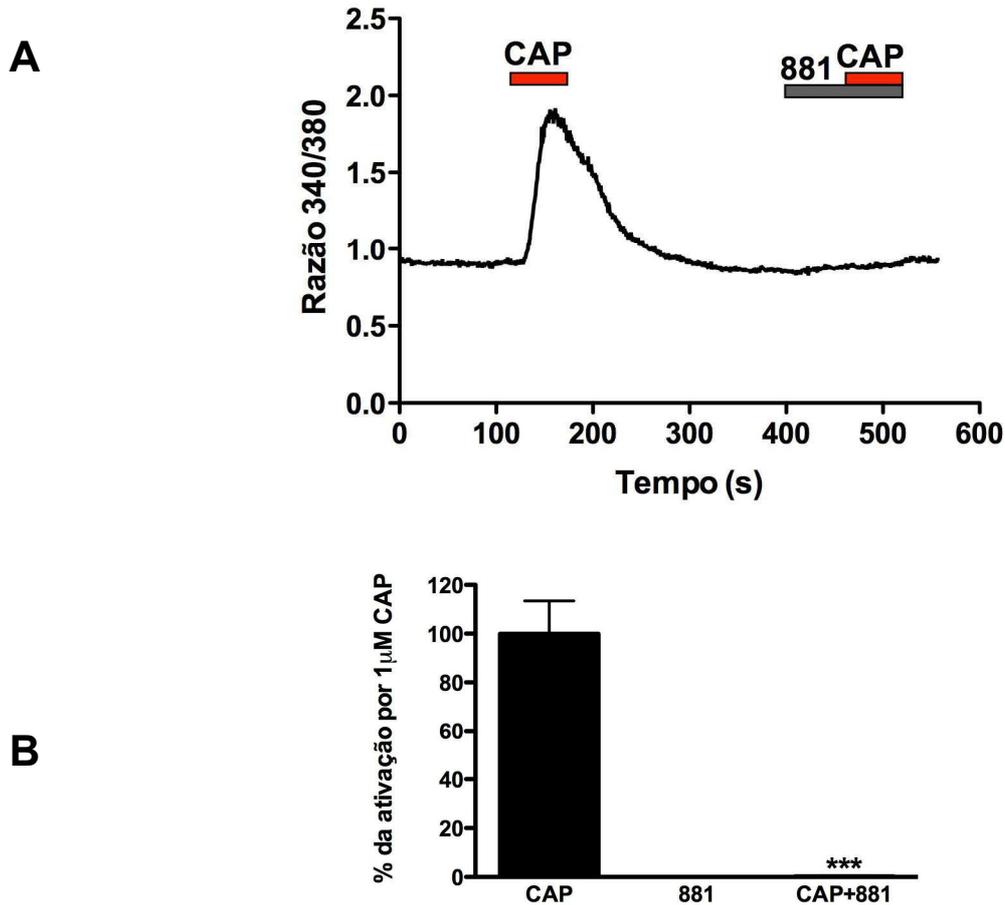


Figura 21: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μ M seguida de 20 μ M LASSBio-881 e capsaicina com LASSBio-881. B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 14$ células de 3 experimentos).

Outro dado importante para ser confirmado foi o potencial agonismo parcial e antagonismo do LASSBio-294. Na figura 25A vemos que novamente a aplicação dessa substância sozinha gerou uma pequena elevação do cálcio (Figura 25B).

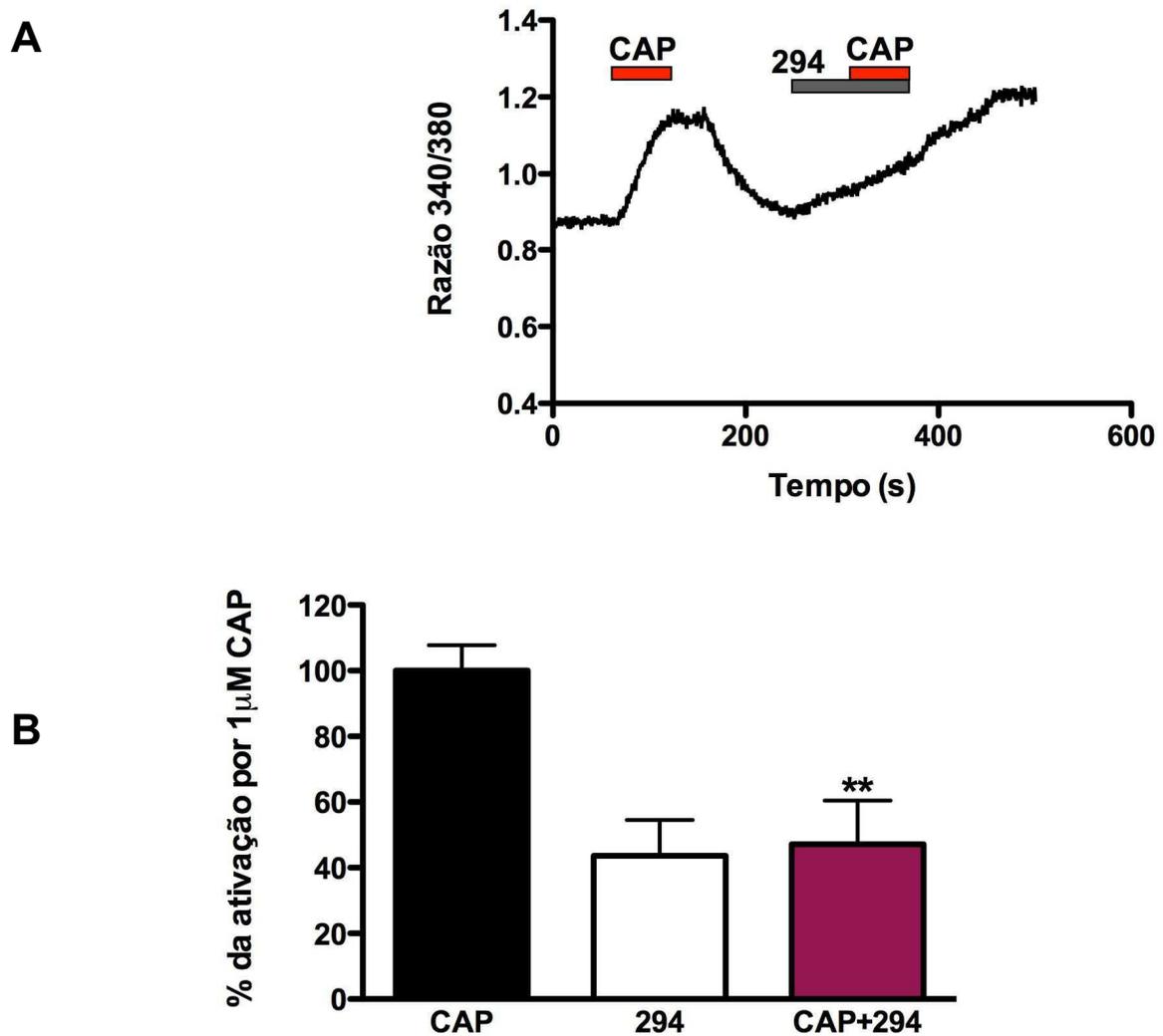


Figura 22: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μM seguida de 20 μM LASSBio-294 e capsaicina com LASSBio-294. B) Quantificação (** $P < 0,01$, $n = 9$ células de 3 experimentos).

Em seguida, foram realizados os experimentos com as demais substâncias. O LASSBio-945, que não havia sido testado na eletrofisiologia, pareceu exibir um perfil antagonista (Figura 26A) e quantificado na figura 26B.

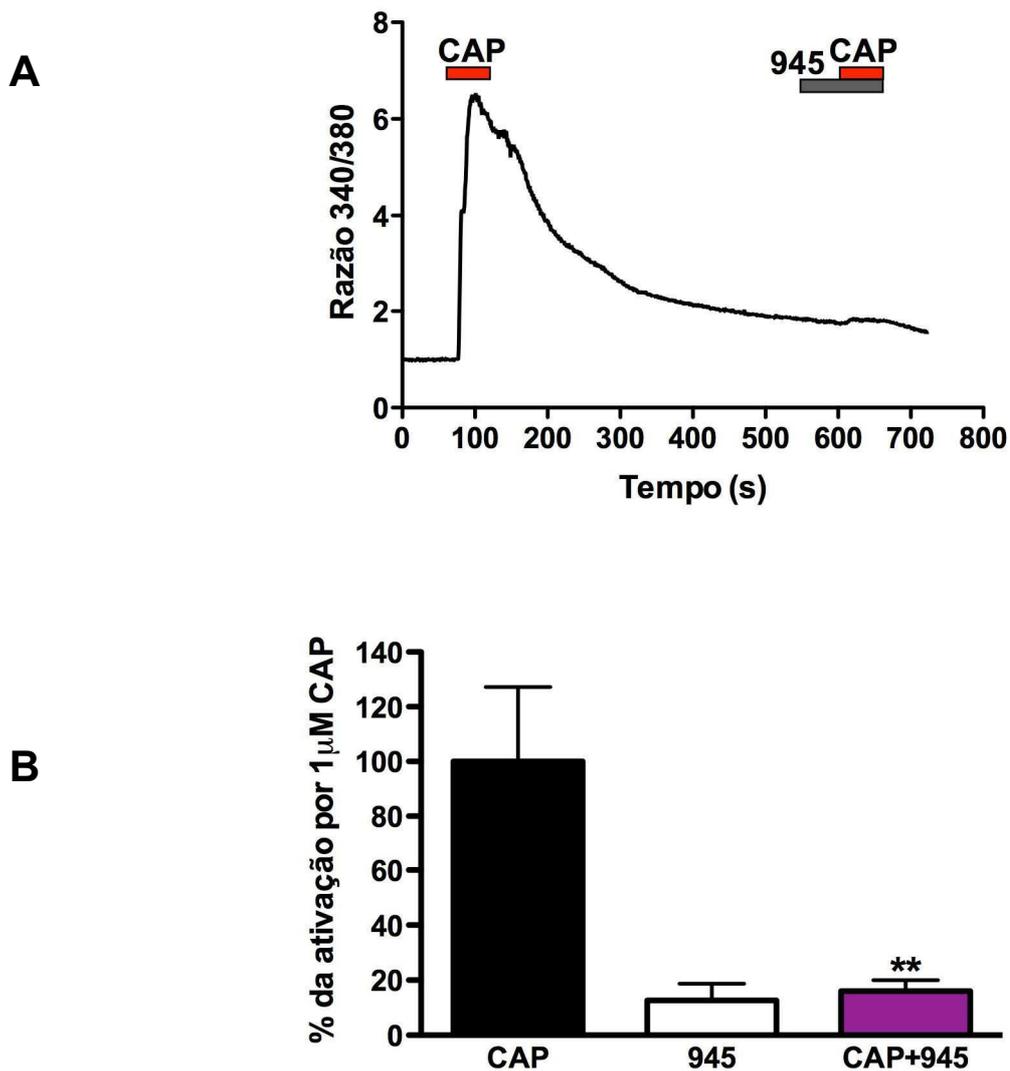


Figura 23: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μ M seguida de 20 μ M LASSBio-945 e capsaicina com LASSBio-945. B) Quantificação (** $P < 0,01$, $n = 7$ células de 3 experimentos).

O LASSBio-123 que na eletrofisiologia havia apresentado uma ativação quando aplicado em ovócitos injetados com TRPV1 menor que 2% e quando co-aplicado com capsaicina praticamente não alterou essa atividade, mas em DRGs a diminuiu para menos do que 50%, conforme a figura 27.

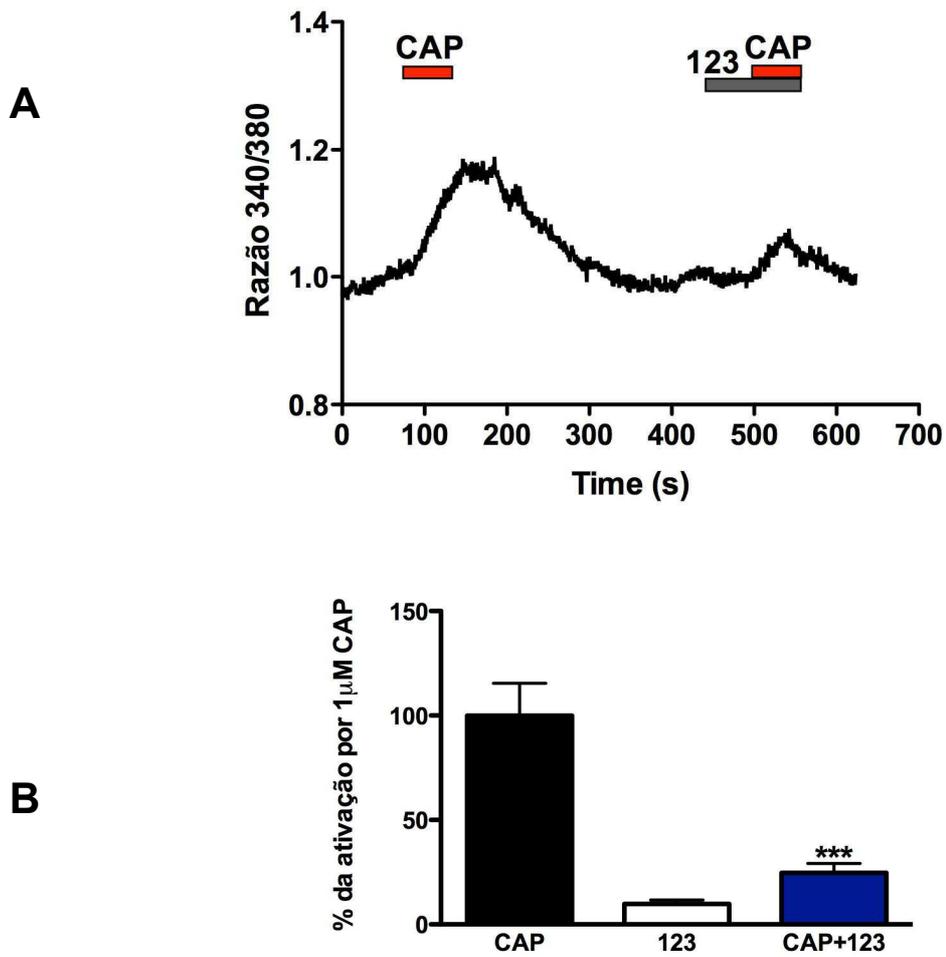


Figura 24: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μ M seguida de 20 μ M LASSBio-123 e capsaicina com LASSBio-123. B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 10$ células de 3 experimentos).

Já o LASSBio-882 apresentou ativação de baixa eficácia com um intenso bloqueio da atividade da capsaicina (Figuras 28A e 28B).

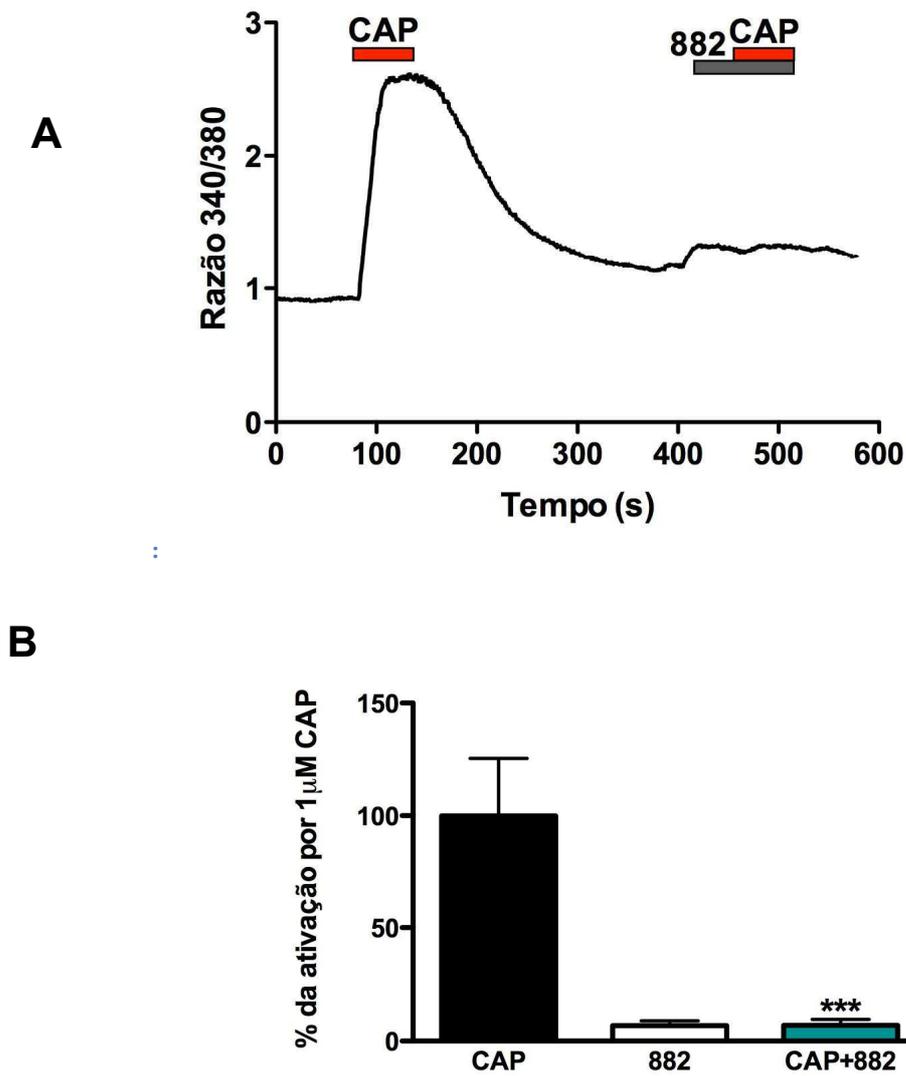


Figura 25: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μ M seguida de 20 μ M LASSBio-882 e capsaicina com LASSBio-882. B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 10$ células de 3 experimentos).

O LASSBio-897 apresentou uma atividade de baixa eficácia agonista e também foi capaz de inibir a atividade da capsaicina (Figura 29A e 29B).

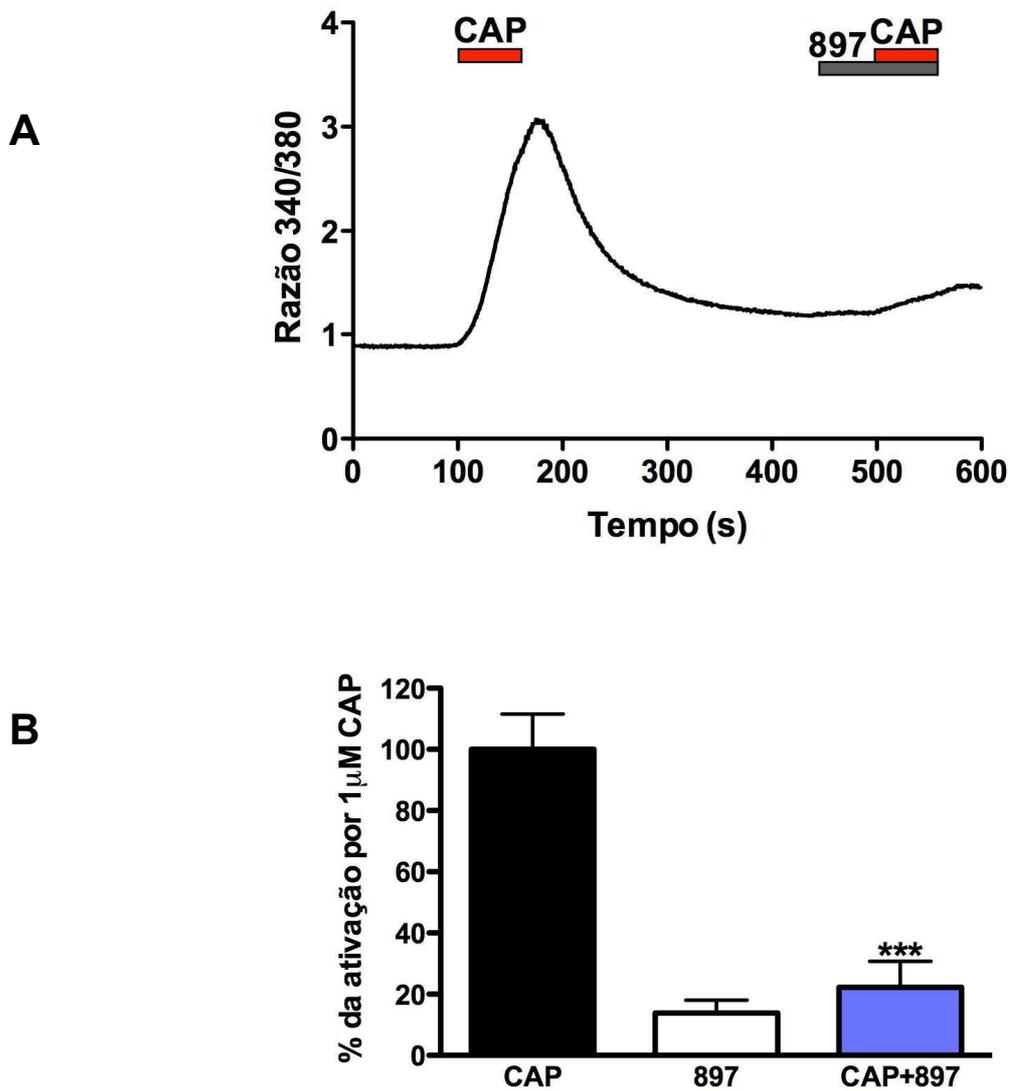


Figura 26: A) Traçado típico da resposta de cálcio de neurônios do DRG a uma aplicação de capsaicina 1 μM seguida de 20 μM LASSBio-897 e capsaicina com LASSBio-897. B) Quantificação (***) $P < 0,001$, $n = 9$ células de 3 experimentos).

Na figura 30, análogo aos gráficos apresentados na eletrofisiologia, comparamos se as substâncias seriam capazes de ativar o receptor TRPV1, bem como o efeito da coaplicação de cada LASSBio com a capsaicina, em relação a uma segunda aplicação da capsaicina 1 μM .

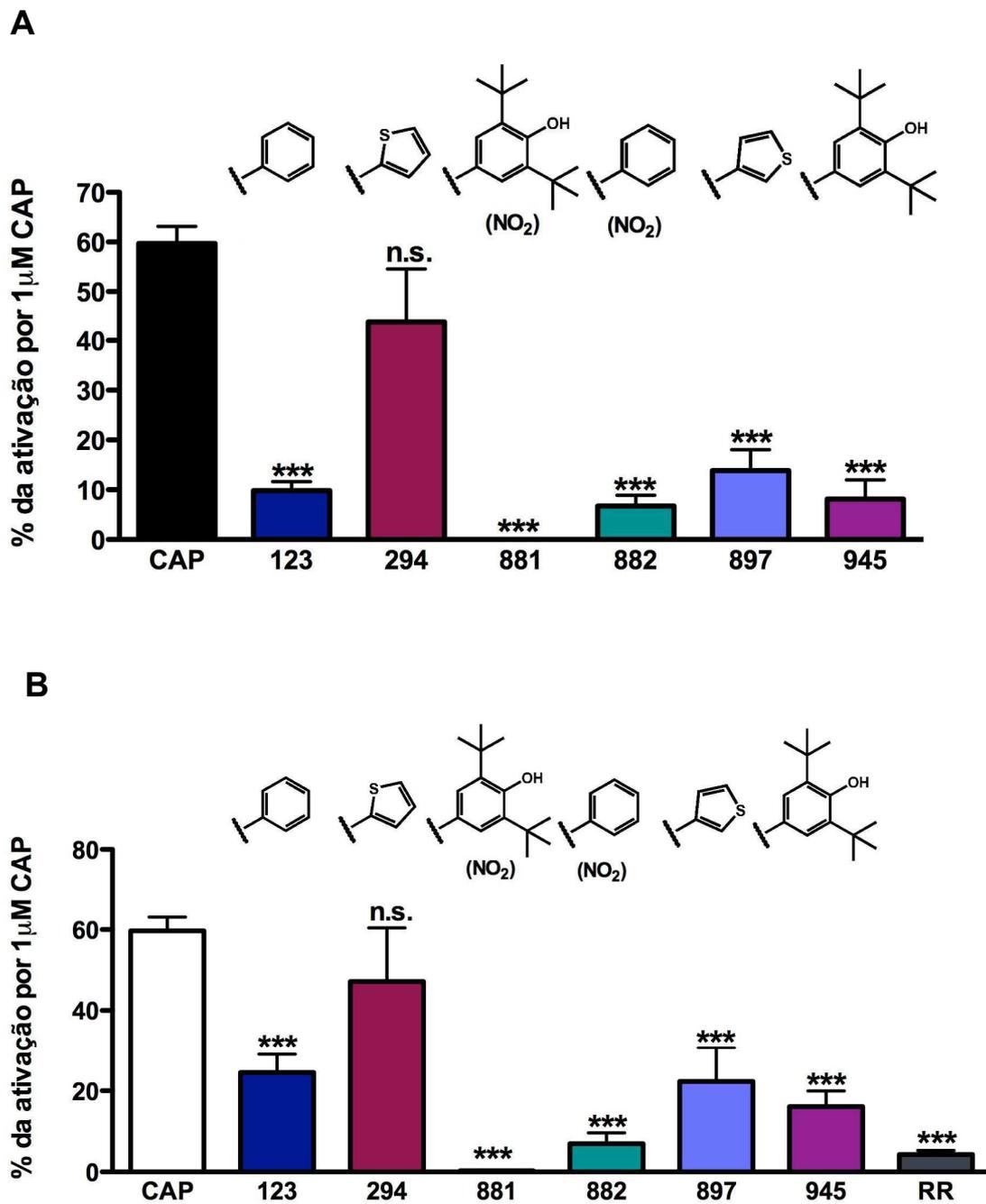


Figura 27: (A) Comparação das atividades dos LASSBios aplicados sozinhos (teste para agonistas) (B) Comparação das atividades dos LASSBios coaplicados com capsaicina (ou RR) e a segunda aplicação de capsaicina apresentada na figura 21 (***) $P < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Eletrofisiologia

Analisando inicialmente a os resultados preliminares da interação dos compostos com o TRPV1, pôde-se chegar a algumas inferências. Na Figura 16 todas as *N*-acilidrazonas foram capazes de ativar o TRPV1, com baixa eficácia, e estas tinham em comum um pequeno grupamento hidrofóbico aromático não substituído (benzênico ou tiofênico), e a ausência do nitro.

Já na presença do pH 5,5, o padrão da Figura 18 é essencialmente o mesmo da Figura 16, porém com aumento da corrente gerada. Esses padrões indicam uma possível cooperação dessas substâncias com o pH ácido ou alosterismo positivo do TRPV1 (Pingle et al., 2007), possivelmente com os prótons modificando a estrutura do canal e facilitando a ligação dos compostos de anel pequeno (tiofênico ou benzeno).

Já em relação aos efeitos na presença da capsaicina, encontramos um padrão bem diferente. Em primeiro lugar, nenhum dos LASSBios aumentou a atividade da capsaicina. Também nota-se que apenas o LASSBio-294 e o 881 foram capazes de inibir moderadamente a corrente causada pela capsaicina.

Os resultados obtidos com o CB1 são indicativos de que o grupamento nitro presente no LASSBio-881 e no LASSBio-882 parece ser importante para a atividade antagonista nesse receptor quando comparado ao 123.

A presença do nitro pode conferir a molécula uma restrição conformacional ausente nas outras substâncias, e futuras análises conformacionais são necessárias para elucidação da contribuição desses efeitos na molécula. O grupamento nitro pode ser um aceptor de elétron, que desempenha um papel crítico na formação de radicais livres (Paulai *et al.*, 2009)

5.2 TRPV1 em células HEK transfectadas

Os experimentos com as células HEK mostraram não serem ideais para este tipo de teste, uma vez que a curva da CAP foi praticamente idêntica à obtida na presença do LASSBio-881. Quando comparamos com dados publicados pelo nosso grupo, realizados em ovócitos, o EC₅₀ da capsaicina foi 24 vezes inferior nos experimentos com a HEK (347 nM em ovócitos e 14 nM na HEK) (Tributino *et al.*, 2010). Outros autores encontraram valores semelhantes para o EC₅₀ da CAP que obtivemos em ovócitos (McNamara *et al.*, 2005). Já havia sido reportado um EC₅₀ da capsaicina menor em células transfectadas comparando com ovócitos, especificamente medindo-se a concentração de cálcio, embora com valores superiores aos reportados aqui (McIntyre *et al.*, 2001). Gavva e colaboradores (2004) também encontraram valores semelhantes de EC₅₀ em células HEK293 transfectadas e medindo-se a captação de ⁴⁵Ca²⁺, cerca de 51 nM. Uma vez que os experimentos reportados aqui diferem dos de Gavva e colaboradores (2004) pelo fato de que medimos a concentração intracelular de cálcio e não a captação desse metal, e considerando haver liberação de estoques intracelulares de cálcio mediada pela entrada na célula do mesmo, essa diferença de potência é perfeitamente explicável.

Porém para o objetivo de testar possíveis antagonistas, essa metodologia que revelou grande sensibilidade à capsaicina, se mostrou não adequada. Então procuramos outros métodos para responder às perguntas do presente trabalho.

5.3 Análise das respostas de cálcio em neurônios sensoriais (DRG)

Uma vez estabelecida a metodologia de obtenção de culturas de DRGs e medidas de ativação pela capsaicina, realizamos testes com concentração fixa das substâncias do LASSBio. Vale ressaltar que, nessas células, o uso de estímulos de pH ácido não seria adequado para medir atividade do TRPV1, uma vez que possuem outros canais sensíveis a prótons como por exemplo o ASIC3, presente em nociceptores (Molliver *et al.*, 2005).

Os experimentos eram iniciados sempre com um pulso de capsaicina, e, após o retorno para a linha basal, o LASSBio era aplicado sozinho para evidenciar alguma possível ativação do receptor, e em seguida era coaplicado com a capsaicina para verificar se ocorreria alguma inibição.

Inicialmente, uma vez que seriam necessárias duas aplicações consecutivas de capsaicina, verificamos se haveria diferença entre a primeira e a segunda aplicação. De fato, observamos uma redução de cerca de 40% da resposta à capsaicina. A dessensibilização do receptor TRPV1 é bem estudada em células de mamíferos, especialmente nas DRGs. Nessas células, via entrada de cálcio pelo próprio TRPV1, a calcineurina é ativada e desfosforila o receptor, reduzindo sua atividade (Mohapatra e Nau, 2005). Esse fenômeno não é observado em ovócitos, onde possivelmente a calcineurina está ausente. Assim sendo, a atividade da segunda aplicação nos DRGs era suficiente para ser medida, e então pudemos prosseguir com os experimentos.

O LASSBio-881 teve sua ação de antagonista do receptor TRPV1 confirmada (Tributino et al., 2010e). Nos ovócitos, o LASSBio-881 aplicado sozinho apresentou 0% de ativação do TRPV1 e, quando co-aplicado com a CAP, reduziu sua atividade em cerca de 40% comparada à CAP apenas. Nos DRGs, essa substância também não apresentou ativação por si só e inibiu completamente a resposta da capsaicina. O LASSBio-881 apresenta um fenol dissubstituído por 2 radicais tert-butila com o benzeno com a subunidade 3,4-metileno dioxola nitrado na posição orto em relação ao grupamento acilidrazônico (Figura 14).

Já o LASSBio-945 é um análogo do LASSBio-881, sem o grupo nitro. Não chegamos a realizar os experimentos de eletrofisiologia com LASSBio-945. Na cultura de DRG, essa substância apresentou uma fraca ativação, cerca de 10%, e uma inibição quando co-aplicado com a capsaicina, reduzindo a atividade da CAP para menos que 20%. Esse resultado aponta para a contribuição importante do grupamento nitro na função no antagonismo do TRPV1. Esse resultado é confirmado quando examinamos o 123 versus o 882 nas respostas medidas em DRG.

O LASSBio-123 apresenta na sua cadeia lateral lipofílica somente uma fenila sem substituintes. Em ovócitos, essa substância apresentou fraca ativação, cerca de 1,4% da resposta da capsaicina, mas quando co-aplicado com a CAP não inibiu a ativação da mesma. Nos DRGs, apresentou uma ativação de cerca de 15% e uma inibição da atividade da CAP em 75%. O que mais chamou a atenção em relação à esse LASSBio foi o aumento da atividade agonista na presença do pH ácido, cerca de 9 vezes. Pretende-se investigar melhor que mecanismo seria responsável por essa diferença. Entretanto, já sabemos que no pH 5 100% das moléculas do LASSBio-123 encontram-se não-ionizadas, conforme avaliação teórica (Munaro-Vieira, 2012). Já no pH 7,4 a porcentagem cai apenas para 98%, portanto a ionização das moléculas em diferentes pH não deve explicar essa potenciação observada em pH ácido.

Já o LASSBio-882 apresenta como substituinte uma fenila e o grupamento nitro na posição 6 da subunidade 3,4-metileno dioxola. Nos ovócitos, apresentou fraca ativação de cerca de 0,5%, e quando co-aplicado com a CAP não inibiu a ativação da mesma da mesma forma que o 123. No DRG, apresentou uma ativação de cerca de 10% e uma inibição da atividade da CAP de 90%. Portanto, os dados de ovócitos e DRGs não são compatíveis em relação a essa substância, o que poderia indicar um outro (ou outros) possíveis alvos farmacológicos para o LASSBio-882.

O LASSBio-294 tem como substituinte a subunidade 2-tiofenila e na eletrofisiologia apresentou ativação de apenas 2,5% e inibição de 20% quando co-aplicado com a capsaicina. Nos DRGs apresentou uma ativação acima de 40% e quando co-aplicado com a CAP reduziu a ativação da CAP para aproximadamente 50%. Porém, essa atividade reduzida com a coaplicação não foi significativamente diferente da segunda aplicação de capsaicina (Figura 30).

Já o 897 possui como substituinte a subunidade 3-tiofenila, apresentando uma ativação menor que 2% e na co-aplicação com a CAP não inibindo a ativação da mesma nos ovócitos. Nos DRGs apresentou uma ativação um pouco menor que 20% com inibição na co-aplicação da CAP em quase 80%. Consistente com

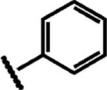
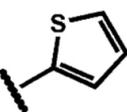
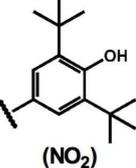
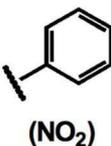
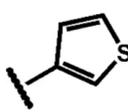
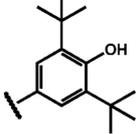
achados *in vivo*, apesar de ser um regioisômero do LASSBio-294, observou-se efeitos bem distintos (ver sessão 5.4).

Comparando o 123 com o 897 (seja ovócito ou DRG), vemos que possuem atividade similar. Os dados do DRG apontam uma atividade antagonista no TRPV1. Comparando o 294 com o 897 e o 123, temos uma mudança de perfil de interação como receptor, de onde parte-se de uma nítida atividade antagonista para um agonismo parcial do 294, supondo a provável importância da posição do enxofre no anel tiofênico em posição regioseletiva.

Essa subunidade aromática da molécula interage com aminoácidos presentes nas regiões transmembranares, se a orientação que antagonistas assumem no receptor forem semelhantes à da capsaicina. A capsaicina deve entrar na célula e se orientar pelo citoplasma, alinhando o grupamento vaniloide com aminoácido aromático situado na borda do receptor com o citoplasma (uma tirosina), e projetando o restante da molécula para dentro do receptor, entre os domínios transmembranares 2 e 3 (Jordt e Julius, 2002a). Sabe-se entretanto que a porção hidrofóbica de antagonistas competitivos do TRPV1 interage com os domínios transmembranares 5 e 6, domínios esses formadores do poro do canal (Kym *et al.*, 2009). E que o volume desses substituintes é crucial para o efeito antagonista.

Considerando as moléculas estudadas com substituinte de maior volume, os LASSBio-881 e LASSBio-945, observamos que de fato inibem o receptor. Entretanto, comparando os dois entre si, nota-se que a presença do grupamento nitro provavelmente influencia a eficiência pela qual a molécula penetra no receptor ou impede a abertura do poro.

Quadro 2: Comparação dos efeitos das substâncias testadas quando co-aplicadas com a capsaicina, entre experimentos com ovócitos e células DRGs. Nesse último caso, as porcentagens foram estimadas (arredondadas) em relação à segunda aplicação de capsaicina.

	123	294	881	882	897	945
LASSBio						
Eletrofisiologia	0%	-20%	-40%	0%	0%	n.d.
Cálcio	-60%	0%	-100%	-80%	-60%	-70%

Deve-se ressaltar que uma avaliação estrutura-atividade completa requereria curvas concentração-resposta e não apenas testes em triagem conforme mostrado aqui para elucidar o perfil de atividade intrínseca e a relação de potência entre as substâncias. Entretanto, os resultados obtidos já fornecem pistas importantes para compreensão das interações entre essas moléculas e os receptores alvo.

5.4. Relação entre os presentes dados e dados *in vivo*:

Algumas das substâncias utilizadas nesse trabalho já foram testadas em estudos *in vivo*, em especial os relacionados à nocicepção. O trabalho de Duarte e colaboradores (2007) apresenta alguns desses experimentos. No teste da formalina, o LASSBio-294 mostrou-se eficaz apenas na fase 2, enquanto que o 881 foi eficaz na fase 1. Já os LASSBio-882 e -945 foram ineficazes em ambas as fases. Porém, o LASSBio-945 é capaz de reduzir o edema induzido por carragenina, enquanto o LASSBio-882 é ineficaz. Ambos 294 e 881 reduzem o edema nessas mesmas condições.

O teste da placa quente, que certamente envolve o receptor TRPV1, no entanto, fornece uma importante distinção entre as substâncias testadas: apenas o LASSBio-881 é eficaz em promover anti-nocicepção nesse caso. Com a ressalva de que esses testes foram feitos com administração oral, e que pode haver efeitos

farmacocinéticos importantes, o resultado da placa quente reflete perfeitamente o resultado obtido na eletrofisiologia, e em parte, confirmado no cálcio.

6 CONCLUSÃO

Os presentes resultados permitiram uma melhor compreensão de como essa série de *N*-acilidrazonas atuam como antagonistas TRPV1 e CB1. No primeiro caso, o que pareceu mais importante foi o volume do grupamento aromático, e no segundo, a presença do grupamento nitro. Novas moléculas poderão ser sintetizadas, baseadas nesses dados e em outro, visando maior potência nesses receptores e eficácia antinociceptiva.

7 REFERENCIAS

- ADAM, L., SALOIS, D., RIHAKOVA, L., LAPOINTE, S., ST-ONGE, S., LABRECQUE, J. e PAYZA, K. Positive allosteric modulators of CB1 receptors. **17th Annual Symposium of the Cannabinoids**, p. 86, 2007.
- BAB, I., ZIMMER, A. e MELAMED, E. Cannabinoids and the skeleton: from marijuana to reversal of bone loss. **Ann. Med.**, vol. 41, p. 560-567, 2009.
- BAEK, J.H., ZHENG, Y., DARLINGTON, C.L. e SMITH, P.F. Cannabinoid CB2 receptor expression in the rat brainstem cochlear and vestibular nuclei. **Acta Otolaryngol.**, vol. 128, p. 961-967, 2008.
- BAKER, M.D. e WOOD, J.N. Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. **Trends Pharmacol. Sci.**, vol. 22, p. 27-31, 2001.
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G. e JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, vol. 139, p. 267-284, 2009b.
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G. e JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, vol. 139, p. 267-284, 2009a.
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G. e JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, vol. 139, p. 267-284, 2009c.
- BERNSTEIN, J.E., PARISH, L.C., RAPAPORT, M., ROSENBAUM, M.M. e ROENIGK, H.H., Jr. Effects of topically applied capsaicin on moderate and severe psoriasis vulgaris. **J. Am. Acad. Dermatol.**, vol. 15, p. 504-507, 1986.
- BISOGNO, T., DE, P.L. e DI, M., V. Fatty acid amide hydrolase, an enzyme with many bioactive substrates. Possible therapeutic implications. **Curr. Pharm. Des**, vol. 8, p. 533-547, 2002.
- BLAIS, P.A., COTE, J., MORIN, J., LAROUCHE, A., GENDRON, G., FORTIER, A., REGOLI, D., NEUGEBAUER, W. e GOBEIL, F., Jr. Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. **Peptides**, vol. 26, p. 1317-1322, 2005.
- BURGESS, G.M., MULLANEY, I., MCNEILL, M., DUNN, P.M. e RANG, H.P. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. **J. Neurosci.**, vol. 9, p. 3314-3325, 1989.
- CATERINA, M.J. e JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu. Rev. Neurosci.**, vol. 24, p. 487-517, 2001.
- CATERINA, M.J., LEFFLER, A., MALMBERG, A.B., MARTIN, W.J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K.R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A.I. e JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, vol. 288, p. 306-313, 2000.

- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. e JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, vol. 389, p. 816-824, 1997a.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. e JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, vol. 389, p. 816-824, 1997b.
- CESARE, P. e MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 93, p. 15435-15439, 1996.
- CHAHL, L.A. TRP channels and psychiatric disorders. **Adv. Exp. Med. Biol.**, vol. 704, p. 987-1009, 2011.
- CHRISTENSEN, R., KRISTENSEN, P.K., BARTELS, E.M., BLIDDAL, H. e ASTRUP, A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, vol. 370, p. 1706-1713, 2007.
- CROMER, B.A. e MCINTYRE, P. Painful toxins acting at TRPV1. **Toxicon**, vol. 51, p. 163-173, 2008.
- DALE, C.S., PAGANO, R.L., RIOLI, V., HYSLOP, S., GIORGI, R. e FERRO, E.S. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. **Peptides**, vol. 26, p. 431-436, 2005.
- DANZIGER, N. e WILLER, J.C. Congenital insensitivity to pain. **Rev. Neurol. (Paris)**, vol. 165, p. 129-136, 2009.
- DEVANE, W.A., DYSARZ, F.A., III, JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S. e HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol. Pharmacol.**, vol. 34, p. 605-613, 1988.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, vol. Suppl 6, p. S27-S35, 1999.
- DI MARZO, V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. **Diabetologia**, vol. 51, p. 1356-1367, 2008.
- DI MARZO, V., BLUMBERG, P.M. e SZALLASI, A. Endovanilloid signaling in pain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, vol. 12, p. 372-379, 2002.
- DODD, G.T., MANCINI, G., LUTZ, B. e LUCKMAN, S.M. The peptide hemopressin acts through CB1 cannabinoid receptors to reduce food intake in rats and mice. **J. Neurosci.**, vol. 30, p. 7369-7376, 2010.
- DUBIN, A.E. e PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J. Clin. Invest**, vol. 120, p. 3760-3772, 2010.
- ENGLAND, S., BEVAN, S. e DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the

- cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol**, vol. 495 (Pt 2), p. 429-440, 1996.
- FEZZA, F., DE, S.C., AMADIO, D. e MACCARRONE, M. Fatty acid amide hydrolase: a gate-keeper of the endocannabinoid system. **Subcell. Biochem.**, vol. 49, p. 101-132, 2008.
- GANJU, P., O'BRYAN, J.P., DER, C., WINTER, J. e JAMES, I.F. Differential regulation of SHC proteins by nerve growth factor in sensory neurons and PC12 cells. **Eur. J. Neurosci.**, vol. 10, p. 1995-2008, 1998.
- GARRISON, S.R. e STUCKY, C.L. The dynamic TRPA1 channel: a suitable pharmacological pain target? **Curr. Pharm. Biotechnol.**, vol. 12, p. 1689-1697, 2011.
- GOMES, I., GRUSHKO, J.S., GOLEBIEWSKA, U., HOOGENDOORN, S., GUPTA, A., HEIMANN, A.S., FERRO, E.S., SCARLATA, S., FRICKER, L.D. e DEVI, L.A. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. **FASEB J.**, vol. 23, p. 3020-3029, 2009.
- GONG, J.P., ONAIVI, E.S., ISHIGURO, H., LIU, Q.R., TAGLIAFERRO, P.A., BRUSCO, A. e UHL, G.R. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Res.**, vol. 1071, p. 10-23, 2006.
- HANUS, L., BU-LAFI, S., FRIDE, E., BREUER, A., VOGEL, Z., SHALEV, D.E., KUSTANOVICH, I. e MECHOULAM, R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 98, p. 3662-3665, 2001.
- HEIMANN, A.S., GOMES, I., DALE, C.S., PAGANO, R.L., GUPTA, A., DE SOUZA, L.L., LUCHESSI, A.D., CASTRO, L.M., GIORGI, R., RIOLI, V., FERRO, E.S. e DEVI, L.A. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 104, p. 20588-20593, 2007b.
- HEIMANN, A.S., GOMES, I., DALE, C.S., PAGANO, R.L., GUPTA, A., DE SOUZA, L.L., LUCHESSI, A.D., CASTRO, L.M., GIORGI, R., RIOLI, V., FERRO, E.S. e DEVI, L.A. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 104, p. 20588-20593, 2007a.
- HERKENHAM, M., LYNN, A.B., LITTLE, M.D., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE COSTA, B.R. e RICE, K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 87, p. 1932-1936, 1990.
- HOKFELT, T., ZHANG, X. e WIESENFELD-HALLIN, Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. **Trends Neurosci.**, vol. 17, p. 22-30, 1994.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, vol. 43, p. 143-201, 1991.

- HOWLETT, A.C. Pharmacology of cannabinoid receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, vol. 35, p. 607-634, 1995.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002a.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002f.
- HOWLETT, A.C. Cannabinoid receptor signaling. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 53-79, 2005.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002d.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002e.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002b.
- HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, vol. 68-69, p. 619-631, 2002c.
- HUANG, S.M., BISOGNO, T., TREVISANI, M., AL-HAYANI, A., DE, P.L., FEZZA, F., TOGNETTO, M., PETROS, T.J., KREY, J.F., CHU, C.J., MILLER, J.D., DAVIES, S.N., GEPPELTI, P., WALKER, J.M. e DI, M., V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol. 99, p. 8400-8405, 2002.
- INSTITUTE OF MEDICINE (US). Committee on Advancing Pain Research and Education. *Relieving Pain in America*. 2011.
- JORDT, S.E. e JULIUS, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. **Cell**, vol. 108, p. 421-430, 2002b.
- JORDT, S.E. e JULIUS, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. **Cell**, vol. 108, p. 421-430, 2002a.
- JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, vol. 29, p. 355-384, 2013.
- JULIUS, D. e BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, vol. 413, p. 203-210, 2001b.
- JULIUS, D. e BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, vol. 413, p. 203-210, 2001a.
- KEDEI, N., SZABO, T., LILE, J.D., TREANOR, J.J., OLAH, Z., IADAROLA, M.J. e BLUMBERG, P.M. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. **J. Biol. Chem.**, vol. 276, p. 28613-28619, 2001a.

- KEDEI, N., SZABO, T., LILE, J.D., TREANOR, J.J., OLAH, Z., IADAROLA, M.J. e BLUMBERG, P.M. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. **J. Biol. Chem.**, vol. 276, p. 28613-28619, 2001b.
- KHANOLKAR, A.D., PALMER, S.L. e MAKRIYANNIS, A. Molecular probes for the cannabinoid receptors. **Chem. Phys. Lipids**, vol. 108, p. 37-52, 2000.
- KOBAYASHI, K., FUKUOKA, T., OBATA, K., YAMANAKA, H., DAI, Y., TOKUNAGA, A. e NOGUCHI, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp Neurol.**, vol. 493, p. 596-606, 2005.
- LEVINE, J.D. e REICHLING, D.B. Textbook of Pain. Wall, P.D. & Melzack, R., Churchill-Livingstone, New York, p. 59-84, 1999.
- LIAO, M., CAO, E., JULIUS, D. e CHENG, Y. Single particle electron cryo-microscopy of a mammalian ion channel. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, vol. 27C, p. 1-7, 2014.
- LO, V.J., FU, J., ASTARITA, G., LA, R.G., RUSSO, R., CALIGNANO, A. e PIOMELLI, D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. **Mol. Pharmacol.**, vol. 67, p. 15-19, 2005.
- LUNDBERG, J.M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacol. Rev.**, vol. 48, p. 113-178, 1996.
- MARSH, S.J., STANSFELD, C.E., BROWN, D.A., DAVEY, R. e MCCARTHY, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. **Neuroscience**, vol. 23, p. 275-289, 1987.
- MATHIE, A. Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain. **J. Pharm. Pharmacol.**, vol. 62, p. 1089-1095, 2010.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. e BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, vol. 346, p. 561-564, 1990c.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. e BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, vol. 346, p. 561-564, 1990a.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C. e BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, vol. 346, p. 561-564, 1990b.
- MCINTYRE, P., MCLATCHIE, L.M., CHAMBERS, A., PHILLIPS, E., CLARKE, M., SAVIDGE, J., TOMS, C., PEACOCK, M., SHAH, K., WINTER, J., WEERASAKERA, N., WEBB, M., RANG, H.P., BEVAN, S. e JAMES, I.F.

- Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). **Br. J. Pharmacol.**, vol. 132, p. 1084-1094, 2001.
- MCNAMARA, F.N., RANDALL, A. e GUNTHORPE, M.J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). **Br. J. Pharmacol.**, vol. 144, p. 781-790, 2005.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N.E., SCHATZ, A.R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B.R., COMPTON, D.R. e . Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem. Pharmacol.**, vol. 50, p. 83-90, 1995.
- MECHOULAM, R., FEIGENBAUM, J.J., LANDER, N., SEGAL, M., JARBE, T.U., HILTUNEN, A.J. e CONSROE, P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. **Experientia**, vol. 44, p. 762-764, 1988.
- MECHOULAM, R. e GAONI, Y. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. **Tetrahedron**, vol. 21, p. 1223-1229, 1965.
- MOHAPATRA, D.P. e NAU, C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, vol. 280, p. 13424-13432, 2005.
- MOLLIVER, D.C., IMMKE, D.C., FIERRO, L., PARE, M., RICE, F.L. e MCCLESKEY, E.W. ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. **Mol. Pain**, vol. 1, p. 35, 2005.
- MOLLIVER, D.C., RADEKE, M.J., FEINSTEIN, S.C. e SNIDER, W.D. Presence or absence of TrkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. **J. Comp Neurol.**, vol. 361, p. 404-416, 1995.
- MOLLIVER, D.C., WRIGHT, D.E., LEITNER, M.L., PARSADANIAN, A.S., DOSTER, K., WEN, D., YAN, Q. e SNIDER, W.D. IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. **Neuron**, vol. 19, p. 849-861, 1997.
- MONTELL, C. e RUBIN, G.M. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, vol. 2, p. 1313-1323, 1989.
- MUNARO-VIEIRA, D.V. **Caracterização estrutura-função de compostos N-acildrazônicos.** (Monografia de Conclusão da Graduação), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L. e BU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, vol. 365, p. 61-65, 1993.
- NAVARRO, H.A., HOWARD, J.L., POLLARD, G.T. e CARROLL, F.I. Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB) receptor by RTI-371, a

- selective inhibitor of the dopamine transporter. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 156, p. 1178-1184, 2009.
- NIEMEYER, B.A. Structure-function analysis of TRPV channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, vol. 371, p. 285-294, 2005.
- NIETO-POSADAS, A., JARA-OSGUERA, A. e ROSENBAUM, T. TRP channel gating physiology. **Curr. Top. Med. Chem.**, vol. 11, p. 2131-2150, 2011.
- NILIUS, B. e VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflugers Arch.**, vol. 451, p. 1-10, 2005.
- NORROD, A.G. e PUFFENBARGER, R.A. Genetic polymorphisms of the endocannabinoid system. **Chem. Biodivers.**, vol. 4, p. 1926-1932, 2007.
- OWSIANIK, G., TALAVERA, K., VOETS, T. e NILIUS, B. Permeation and selectivity of TRP channels. **Annu. Rev. Physiol**, vol. 68, p. 685-717, 2006.
- PATAPOUTIAN, A., TATE, S. e WOOLF, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug Discov.**, vol. 8, p. 55-68, 2009.
- PAULAI, F.R., SERRANO, S.H.P. e TAVARES, L.C. Aspects of bioactivity and toxicity of nitrocompounds. **Química Nova**, vol. 32, p. 1013-1020, 2009.
- PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nat. Rev. Neurosci.**, vol. 8, p. 71-80, 2007.
- PERTWEE, R.G. Pharmacological actions of cannabinoids. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 1-51, 2005.
- PERTWEE, R.G., HOWLETT, A.C., ABOOD, M.E., ALEXANDER, S.P., DI, M., V, ELPHICK, M.R., GREASLEY, P.J., HANSEN, H.S., KUNOS, G., MACKIE, K., MECHOULAM, R. e ROSS, R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). **Pharmacol. Rev.**, vol. 62, p. 588-631, 2010.
- PINGLE, S.C., MATTA, J.A. e AHERN, G.P. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 155-171, 2007.
- POLIAKOV, I. e TOTH, C. The impact of pain in patients with polyneuropathy. **Eur. J. Pain**, vol. 15, p. 1015-1022, 2011.
- PORTER, A.C., SAUER, J.M., KNIERMAN, M.D., BECKER, G.W., BERNA, M.J., BAO, J., NOMIKOS, G.G., CARTER, P., BYMASTER, F.P., LEESE, A.B. e FELDER, C.C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 301, p. 1020-1024, 2002.
- PREMKUMAR, L.S. e AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, vol. 408, p. 985-990, 2000.

- RE, G., BARBERO, R., MIOLO, A. e DI, M., V. Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. **Vet. J.**, vol. 173, p. 21-30, 2007.
- RIOLI, V., GOZZO, F.C., HEIMANN, A.S., LINARDI, A., KRIEGER, J.E., SHIDA, C.S., ALMEIDA, P.C., HYSLOP, S., EBERLIN, M.N. e FERRO, E.S. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, vol. 278, p. 8547-8555, 2003b.
- RIOLI, V., GOZZO, F.C., HEIMANN, A.S., LINARDI, A., KRIEGER, J.E., SHIDA, C.S., ALMEIDA, P.C., HYSLOP, S., EBERLIN, M.N. e FERRO, E.S. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, vol. 278, p. 8547-8555, 2003a.
- SCRIMA, M., DI, M.S., GRIMALDI, M., MASTROGIACOMO, A., NOVELLINO, E., BIFULCO, M. e D'URSI, A.M. Binding of the hemopressin peptide to the cannabinoid CB1 receptor: structural insights. **Biochemistry**, vol. 49, p. 10449-10457, 2010.
- SHU, X. e MENDELL, L.M. Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. **Neurosci. Lett.**, vol. 274, p. 159-162, 1999.
- STAROWICZ, K., NIGAM, S. e DI, M., V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. **Pharmacol. Ther.**, vol. 114, p. 13-33, 2007.
- STEMKOWSKI, P.L. e SMITH, P.A. Sensory neurons, ion channels, inflammation and the onset of neuropathic pain. **Can. J. Neurol. Sci.**, vol. 39, p. 416-435, 2012.
- SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A. e WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 215, p. 89-97, 1995.
- SVIZENSKA, I., DUBOVY, P. e SULCOVA, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 90, p. 501-511, 2008.
- SZABO, B. e SCHLICKER, E. Effects of cannabinoids on neurotransmission. **Handb. Exp. Pharmacol.**, p. 327-365, 2005.
- SZALLASI, A., CORTRIGHT, D.N., BLUM, C.A. e EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat. Rev. Drug Discov.**, vol. 6, p. 357-372, 2007a.
- SZALLASI, A., CORTRIGHT, D.N., BLUM, C.A. e EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat. Rev. Drug Discov.**, vol. 6, p. 357-372, 2007b.

- SZOLCSANYI, J. e SANDOR, Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. **Trends Pharmacol. Sci.**, vol. 33, p. 646-655, 2012.
- TANDRUP, T. Are the neurons in the dorsal root ganglion pseudounipolar? A comparison of the number of neurons and number of myelinated and unmyelinated fibres in the dorsal root. **J. Comp Neurol.**, vol. 357, p. 341-347, 1995.
- TOMINAGA, M., CATERINA, M.J., MALMBERG, A.B., ROSEN, T.A., GILBERT, H., SKINNER, K., RAUMANN, B.E., BASBAUM, A.I. e JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, vol. 21, p. 531-543, 1998b.
- TOMINAGA, M., CATERINA, M.J., MALMBERG, A.B., ROSEN, T.A., GILBERT, H., SKINNER, K., RAUMANN, B.E., BASBAUM, A.I. e JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, vol. 21, p. 531-543, 1998a.
- TOMINAGA, M. e JULIUS, D. Capsaicin receptor in the pain pathway. **Jpn. J. Pharmacol.**, vol. 83, p. 20-24, 2000.
- TOMINAGA, M. e TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflugers Arch.**, vol. 451, p. 143-150, 2005.
- TRIBUTINO, J.L., SANTOS, M.L., MESQUITA, C.M., LIMA, C.K., SILVA, L.L., MAIA, R.C., DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., CASTRO, N.G., MIRANDA, A.L. e GUIMARAES, M.Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 159, p. 1716-1723, 2010b.
- TRIBUTINO, J.L., SANTOS, M.L., MESQUITA, C.M., LIMA, C.K., SILVA, L.L., MAIA, R.C., DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., CASTRO, N.G., MIRANDA, A.L. e GUIMARAES, M.Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 159, p. 1716-1723, 2010d.
- TRIBUTINO, J.L., SANTOS, M.L., MESQUITA, C.M., LIMA, C.K., SILVA, L.L., MAIA, R.C., DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., CASTRO, N.G., MIRANDA, A.L. e GUIMARAES, M.Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 159, p. 1716-1723, 2010a.
- TRIBUTINO, J.L., SANTOS, M.L., MESQUITA, C.M., LIMA, C.K., SILVA, L.L., MAIA, R.C., DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., CASTRO, N.G., MIRANDA, A.L. e GUIMARAES, M.Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 159, p. 1716-1723, 2010c.

- TRIBUTINO, J.L., SANTOS, M.L., MESQUITA, C.M., LIMA, C.K., SILVA, L.L., MAIA, R.C., DUARTE, C.D., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., CASTRO, N.G., MIRANDA, A.L. e GUIMARAES, M.Z. LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 159, p. 1716-1723, 2010e.
- TRIBUTINO, J.L.M. **Estudo do perfil anti-inflamatório e neuroprotetor de novos análogos do composto LASSBio 294.** (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- VAN GAAL, L.F., RISSANEN, A.M., SCHEEN, A.J., ZIEGLER, O. e ROSSNER, S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. **Lancet**, vol. 365, p. 1389-1397, 2005.
- VON HEHN, C.A., BARON, R. e WOOLF, C.J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, vol. 73, p. 638-652, 2012.
- WANG, Z.Y. e HAKANSON, R. Effects of ruthenium red and capsazepine on C-fibres in the rabbit iris. **Br. J. Pharmacol.**, vol. 110, p. 1073-1078, 1993.
- WEYERBACHER, A.R., XU, Q., TAMASDAN, C., SHIN, S.J. e INTURRISI, C.E. N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. **Pain**, vol. 148, p. 237-246, 2010.
- WOMACK, K.B., GORDON, S.E., HE, F., WENSEL, T.G., LU, C.C. e HILGEMANN, D.W. Do phosphatidylinositides modulate vertebrate phototransduction? **J. Neurosci.**, vol. 20, p. 2792-2799, 2000.
- WOOD, J.N., WINTER, J., JAMES, I.F., RANG, H.P., YEATS, J. e BEVAN, S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. **J. Neurosci.**, vol. 8, p. 3208-3220, 1988.
- WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **J. Clin. Invest**, vol. 120, p. 3742-3744, 2010a.
- WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **J. Clin. Invest**, vol. 120, p. 3742-3744, 2010b.
- ZOTTERMAN, Y. Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. **J. Physiol**, vol. 95, p. 1-28, 1939.
- ZYGMUNT, P.M., PETERSSON, J., ANDERSSON, D.A., CHUANG, H., SORGARD, M., DI, M., V, JULIUS, D. e HOGESTATT, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, vol. 400, p. 452-457, 1999.