



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**ERIODICTIOL: UM FLAVONÓIDE ANTAGONISTA DO RECEPTOR  
TRPV1 COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MATEUS FORTES ROSSATO**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

# **ERIODICTIOL: UM FLAVONÓIDE ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPV1 COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**Por**

**Mateus Fortes Rossato**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2010**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Naturais e Exatas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:**  
**Bioquímica Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ERIODICTIOL: UM FLAVONÓIDE ANTAGONISTA DO RECEPTOR  
TRPV1 COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

elaborada por

**Mateus Fortes Rossato**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Juliano Ferreira, Dr. (Orientador)**

---

**Thiago Mattar Cunha, Dr. (FMRP - USP)**

---

**Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria, 13 de agosto de 2010**

## AGRADECIMENTOS

Topo o passo, seja qual for à direção tomada, inicia sempre com aqueles que seguram nossa mão e nos mostram como firmar os pés ao chão, como encontrar o equilíbrio perfeito a cada passo. Uma vez com a força e destreza para a caminhada, segue-se a encruzilhada das decisões, de qual caminho tomar e para qual lado seguir. Após ter sido escolhida a jornada a caminhar ainda assim falta o apoio para levantar em cada queda, cada obstáculo. Por muita sorte e felicidade, em cada um desses momentos decisivos sempre tive alguém que se não disposto a me dar a mão, ao menos a seguir comigo na trilha incerta. A todos esses, não tenho outra forma de expressar minha gratidão e felicidade a não ser por um simples muito obrigado.

Desde os primeiros passos até o momento em que encerro este caminho (mas não a caminhada), algumas pessoas sempre estiveram presentes me incentivando e dando forças nas horas mais alegres e escuras: Meu pai João Luiz, minha mãe Rose Mary e meu irmão Giuliano, que sempre depositaram sua confiança e incentivo incondicional na escolha de me tornar aquilo que tanto ansiei, e que com este trabalho aproximo-me mais. A vocês três um profundo agradecimento especial.

Felizmente, neste caminho encontrei outras pessoas, de passagem ou não, que acabaram contribuindo com o processo com muitas risadas, lágrimas e trabalho. Estas pessoas não são a família de sangue ao qual pertenço, mas se tornaram minha família de coração. Não somente uma, mas várias famílias, uma árvore completa que sempre soube lançar uma sombra boa sobre o caminhante. Jackson, Lisânia, Marcio (Ney), Adriano e Andrea (Família Walker), os primeiros a reconhecer o valor de uma boa piadinha *nerd* (vulgo PND – piadinha *nerd* do dia), mesmo quando desnecessária ou em exagero. Foram também os primeiros a realmente embarcar na caminhada, muitas vezes como meros espectadores, mas sempre como uma ótima companhia.

Além desses, houve também aquele que por puro acaso entrou nessa viagem, e até hoje permanece: Pablo, incontestavelmente um caminhante fundamental com o qual sempre contei, e sei que sempre poderei contar. Além de trazer a força que muitas vezes precisei, trouxe também o resto de sua família

“criada”, que hoje também crio com muito carinho (Família Dosusados), em especial alguns parentes, como Ari, Marcelo (Vulgo Guegue) e Alexandre (Xandy!).

Gostaria de agradecer a aqueles que participaram da pavimentação da estrada também. Inicialmente ao Professor Juliano, que mesmo sem conhecer esse caminhante perdido e sem referencias, resolveu dar um voto de confiança apostar no incerto. Espero sempre poder retribuir essa confiança e empenho no meu desenvolvimento e de meu trabalho, confiança essa fundamental.

Também aos meus queridos participantes do “Grupo do Bem”, que participaram como colaboradores do trabalho, como Gabriela, Jonatas, Cristiani e Ana Paula, e também aos que sempre estiveram ao meu lado, como Mariane, Carin e Flávia. Agradeço também aos demais colegas de trabalho do LABNEURO que ajudaram sempre que necessário, e aos professores Thiago Mattar Cunha e Cristina Wayne Nogueira, componentes da banca de avaliação deste trabalho.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos. A todos aqueles que, de uma forma e outra, compartilham de meus ideais, a minha gratidão e respeito. Obrigado!

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos...”*

*Saber que realmente existe aquilo que é impenetrável a nós, e que se manifesta como a mais alta das sabedorias e radiante beleza, que as nossas faculdades embotadas só podem entender em suas formas mais primitivas, esse conhecimento, esse sentimento está no centro mesmo da verdadeira religiosidade...*

*A experiência cósmica religiosa é a mais forte e viva fonte de pesquisa científica.”*

**Albert Einstein**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### ERIODICTIOL: UM FLAVONÓIDE ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPV1 COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Autor: Mateus Fortes Rossato

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da defesa: Santa Maria, 13 de Agosto de 2010.

O receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) é um canal iônico permeável a cátions ativado por uma série de estímulos nocivos, como calor, acidificação e agentes irritantes como a capsaicina. Este receptor é responsável pela detecção e transmissão da dor aguda e crônica. Devido a isso, substâncias que modulem a atividade deste receptor apresentam um potencial clínico para o tratamento da dor. Assim, este trabalho objetiva a possível interação do flavonóide eriodictiol com o receptor TRPV1. Inicialmente, observamos que o eriodictiol foi capaz de deslocar o radioligante [<sup>3</sup>H]-resiniferatoxina, em ensaio de união específica, do receptor TRPV1 com uma concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) de 46.9 (20.70 - 118.9) nM. Ao mesmo tempo, o eriodictiol também inibiu o influxo de cálcio estimulado por capsaicina com IC<sub>50</sub> de 44,4 (15,6 – 125,1) nM, sugerindo que este aja como um antagonista do receptor. Além disso, também observamos que o eriodictiol induz antinocicepção no teste da capsaicina intraplantar com efeito máximo de 49,0±10.5 e 63,9±4.0 % de inibição máxima para o tratamento oral e intratecal, respectivamente, e com uma dose efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) de 2,4 (1,0 – 5,5) mg/kg 2,2 (1,6 – 2,9) nmol/site, respectivamente. Além disso, não observamos alterações na atividade locomotora ou temperatura corporal dos animais. A administração oral de eriodictiol também foi capaz de prevenir a nocicepção induzida por capsaicina intratecal (71,7±5,7 % de inibição). Ao mesmo tempo, o eriodictiol também aboliu a hiperalgesia térmica e reduziu a alodínia mecânica (62,4±9,2 %) induzidas por adjuvante completo de Freund. Da mesma forma, o eriodictiol também preveniu totalmente a diminuição de tiois não protéicos e formação de 3-nitrotirosina (3-NT) espinhais induzidas por capsaicina, ao passo que apresentou atividade antioxidante direta no teste de neutralização do radical ABTS. Em conclusão, nossos resultados mostram que o eriodictiol age como um antagonista do receptor TRPV1, com atividade antioxidante, induzindo antinocicepção sem os efeitos colaterais e limitações esperados para antagonistas do receptor TRPV1.

**Palavras-chave:** 3-NT; ensaio de ligação específica, Influxo de cálcio, eriodictiol, dor, TRPV1, tiois.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Eriodictyol: A flavonoid antagonist of TRPV1 receptor with antioxidant activity**

Author: Mateus Fortes Rossato

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, august 13<sup>st</sup>, 2010.

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a calcium permeable channel responsible for the transduction and modulation of acute and chronic pain signaling, being a potential target for treatment of different pain disorders. In spite of that, AMG517, a TRPV1 antagonist, presents several clinical limitations, such as the development of severe hyperthermia. The aim of this study was to investigate the possible interaction of the flavonoid eriodictyol with the TRPV1 receptor and its putative antinociceptive and hyperthermic effect. Eriodictyol was able to displace the [3H]-resiniferatoxin binding ( $IC_{50} = 47$  (21 - 119) nM) and to inhibit the calcium influx mediated by capsaicin ( $IC_{50} = 44$  (16 - 125) nM), suggesting that eriodictyol acts as a TRPV1 antagonist. Moreover, eriodictyol induces antinociception in the intraplantar capsaicin test, with maximal effect of  $49 \pm 10$  and  $64 \pm 4\%$  of inhibition for oral ( $ED_{50} = 2$  (1-5) mg/kg) and intrathecal ( $ED_{50} = 2$  (1-3) nmol/site) routes, respectively. Concomitantly, eriodictyol did not induce any alteration on body temperature or locomotor activity. Orally administered eriodictyol (4.5 mg/kg) prevented the nociception induced by intrathecal injection of capsaicin ( $72 \pm 6\%$  of inhibition), the non-protein thiol loss and the 3-nitrotyronise (3-NT) formation induced by capsaicin in spinal cord. Eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) also reduced the thermal hyperalgesia (100% of inhibition) and mechanical allodynia ( $62 \pm 9\%$  of inhibition) elicited by complete Freund's adjuvant (CFA) paw injection. In conclusion, Eriodictyol acts as an antagonist of TRPV1 receptor and an antioxidant, inducing antinociception without some side effects and limitations expected for TRPV1 antagonists, as hyperthermia.

**Keywords:** 3-NT, Binding, Calcium Influx, Eriodictyol, Pain, TRPV1, Thiol.



## LISTA DE ABREVIATURAS

12-HPETE	.....	12-hidroperoxi-eicosatetraenóico
3-NT	.....	3-nitrotirosina
Arg	.....	Arginina
ATP	.....	Adenosina trifosfato
CAT	.....	Catalase
CFA	.....	Adjuvante completo de Freund
CGRP	.....	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cys	.....	Cisteína
DE <sub>50</sub>	.....	Dose efetiva 50%
DMSO	.....	Dimetilsulfóxido
DRG	.....	Gânglio da raiz dorsal
DTT	.....	Ditiotreitol
EAAT	.....	Transportador de aminoácido excitatório
ED <sub>50</sub>	.....	Effective dose 50%
ER	.....	Espécies reativas
EROs	.....	Espécies reativas de oxigênio
Glu	.....	Glutamato
GOx	.....	Glutaciona oxidase
GPx	.....	Glutaciona peroxidase
GR	.....	Glutaciona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	.....	Peróxido de hidrogênio
IC <sub>50</sub>	.....	Concentração inibitória 50%
NAC	.....	N-acetilcisteína
NADA	.....	N-araquidonoil
NADH	.....	Adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	.....	Adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NMDA	.....	N-metil-D-aspartato
NO	.....	Óxido nítrico
NOS	.....	Óxido nítrico sintase
Met	.....	Metionina
O <sub>2</sub>	.....	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	.....	Ânion superóxido
-OH	.....	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	.....	Peroxinitrito
RTX	.....	Resiniferatoxina

Ser	.....	Serina
SNC	.....	Sistema nervoso central
Thr	.....	Triptofano
TRP	.....	Receptores de potencial transitório
TRPA	.....	Receptores de potencial transitório anquirina
TRPC	.....	Receptores de potencial transitório canônico
TRPM	.....	Receptores de potencial transitório melastatina
TRPML	.....	Receptores de potencial transitório mucolipina
TRPN	.....	Receptores de potencial transitório não sensível a estímulo mecânico
TRPP	.....	Receptores de potencial transitório policistina
TRPV	.....	Receptores de potencial transitório vanilóide
Tyr	.....	Tirosina

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1:</b> Estrutura química dos ligantes do receptor TRPV1 capsaicina e eriodictiol.....	5
---	---

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Divisão das subfamílias dos canais TRP.....	10
<b>Figura 2:</b> Representação espacial da estrutura das diferentes famílias de receptores TRP.....	11
<b>Tabela 1:</b> Produtos naturais com afinidade pelo receptor TRPV1.....	16
<b>Tabela 2:</b> Produção e características das principais espécies reativas formadas no organismo.....	21

### MANUSCRITO

<b>Figure 1:</b> Chemical structures of the TRPV1 receptor ligands (A) capsaicin and (B) the flavonoid eriodictyol.....	58
<b>Figure 2:</b> Effects of eriodictyol on the TRPV1 receptor.....	59
<b>Figure 3:</b> Antinociceptive effect of eriodictyol on the capsaicin test .....	60
<b>Figure 4:</b> Effect of eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.), SB366791 (10 mg/kg, p.o.) and AMG9810 (10 mg/kg, p.o.) on the nociception induced by complete Freund 's adjuvant (CFA).....	61
<b>Figure 5:</b> Body temperature measured after treatment with eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.), SB-366971 (10 mg/kg, p.o.) or AMG9810 (10 mg/kg, p.o.).....	62
<b>Figure 6:</b> Markers of oxidative stress levels measured in lumbar spinal cord sample 5 min after intraplantar capsaicin injection (1 nmol/paw).....	63
<b>Table I:</b> Side effects evaluated 1 h after vehicle or eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) administration.....	64

## SUMÁRIO

RESUMO.....	Vii
ABSTRACT.....	Viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo Geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. Canais de potencial transitório – TRP.....	9
4.2. Receptor de potencial transitório vanilóide 1 – TRPV1.....	12
4.2.1. Caracterização histórica.....	12
4.2.2. Aspectos gerais.....	14
4.2.3. TRPV1 e nocicepção.....	17
4.3. Estresse Oxidativo.....	19
4.3.1. Fontes geradoras de espécies reativas.....	19
4.3.2. Estresse oxidativo.....	20
4.3.3. Estresse oxidativo e nocicepção.....	22
4.4. Eriodictiol.....	24
5. ARTIGO.....	26
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	70

---

## 1. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo. As seções Materiais e Métodos e Resultados, encontram-se no próprio artigo.

Os itens discussão, conclusões e referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão desta dissertação.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica *Biochemical Pharmacology* a qual foi submetido.

---

## 2. INTRODUÇÃO

Os receptores de potencial transitório (TRP) são uma superfamília de canais iônicos formados por seis domínios transmembrana permeáveis a cátions, principalmente cálcio (Nilius *et al.*, 2007). O receptor TRPV1 pertence à subfamília vanilóide e é ativado por uma série de estímulos nocivos, como calor, acidificação e agentes irritantes químicos como a capsaicina (princípio ativo da pimenta vermelha). Este receptor é estimulado também por diferentes substâncias endógenas, como a anandamida e leucotrieno B4. Atualmente, tem-se observado a participação deste receptor em uma série de condições patológicas, como processos inflamatórios e neuropáticos (Caterina *et al.*, 1997; Montell, 2005).

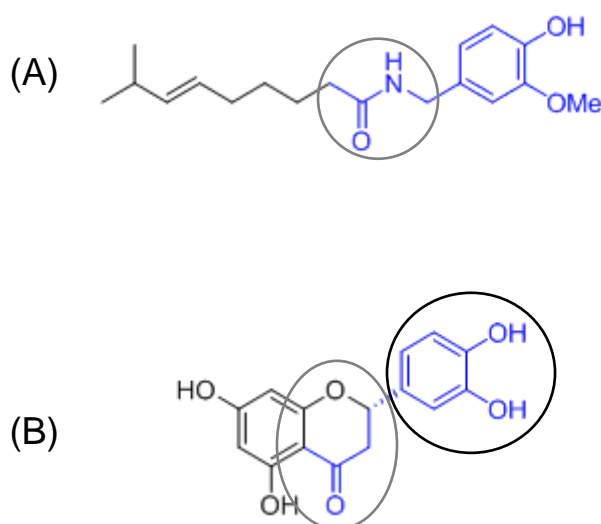
De fato, já foi demonstrado que antagonistas do receptor TRPV1 apresentam um grande potencial antinociceptivo em diferentes modelos de dor em animais, tanto em dores inflamatórias crônicas quando de origem neuropática (Honore *et al.*, 2005; Pomonis *et al.*, 2003). Além disso, sua participação também já foi demonstrada no processo de integração e transmissão espinhal da dor (Caterina *et al.*, 2000; Bölcskei *et al.*, 2005; Ta *et al.*, 2010). Desse modo, a modulação farmacológica do receptor TRPV1 tem sido apontada como uma importante terapia para o controle de dores de difícil tratamento, como neuropatias (Wong *et al.*, 2009).

Recentemente foi realizada uma triagem em humanos utilizando o antagonista AMG517. Antes da conclusão do trabalho, os testes foram interrompidos devido ao desenvolvimento de efeitos adversos graves, como hipertermia (Gavva *et al.*, 2008). Por isso, a procura por novas substâncias que sejam capazes de atuar sobre o receptor TRPV1 com o desenvolvimento de nenhum efeito adverso, ou efeitos menos graves é necessária. Como esse intuito, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo triagens com compostos isolados de plantas com atividade antinociceptiva para descobrir moléculas naturais que atuem sobre este receptor. Durante estes testes, descobrimos o composto eriodictiol (3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavanona), um flavonóide com algumas características estruturais geralmente encontradas em ligantes do receptor TRPV1 (Figura 1). Comparando suas estruturas, é possível identificar regiões bioisostéricas entre as duas moléculas (Figura 1: destaque em azul) localizadas na região A, responsável por conferir afinidade ao sítio vanilóide, e também na região B, responsável por conferir uma conformação estrutural favorável a interação da molécula com o receptor (Walpole *et al.*, 1993a; Walpole *et al.*, 1993b). Além disso, o eriodictiol também apresenta atividade antioxidante (Koleckar *et al.*, 2008) e alguns trabalhos indicam que



compostos com esse tipo de atividade, como a N-acetilcisteína (NAC) induzem antinociceção em diferentes testes de dor em animais (Hacimuftuoglu *et al.*, 2006). Assim, esse efeito poderia contribuir para uma possível atividade antinociceptiva do eriodictiol.

Devido a isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a possível interação do eriodictiol com o receptor TRPV1 e caracterizar sua atividade antinociceptiva e hipertermiante.



**Figura 1:** Estrutura química dos ligantes do receptor TRPV1 (A) capsaicina e (B) o flavonóide eriodictiol (3', 4', 5, 7- tetrahidroxiflavanona). As regiões destacadas em azul representam as regiões bioisostéricas entre as duas estruturas, o círculo preto indica a região A e o círculo cinza indica a região B.

---

**3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo geral

Investigar a possível interação do flavonóide eriodictiol com o receptor TRPV1 e caracterizar sua atividade antinociceptiva e hipertermiante.

### 3.2. Objetivos específicos

- Investigar se o eriodictiol desloca o radioligante [<sup>3</sup>H]-resiniferatoxina do sítio vanilóide do receptor TRPV1 em ensaio de ligação específica;
- Avaliar se o flavonóide eriodictiol inibe o influxo de cálcio estimulado por capsaicina, em sinaptossomas;
- Averiguar se o eriodictiol previne a nocicepção induzida por capsaicina quando administrado por via oral e intratecal;
- Verificar se o eriodictiol apresenta efeito anti-hiperalgésico e anti-alodínico em um modelo de inflamação crônica induzida por adjuvante;
- Pesquisar se o eriodictiol promove alterações na temperatura corporal dos animais tratados
- Investigar a possível atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do eriodictiol.

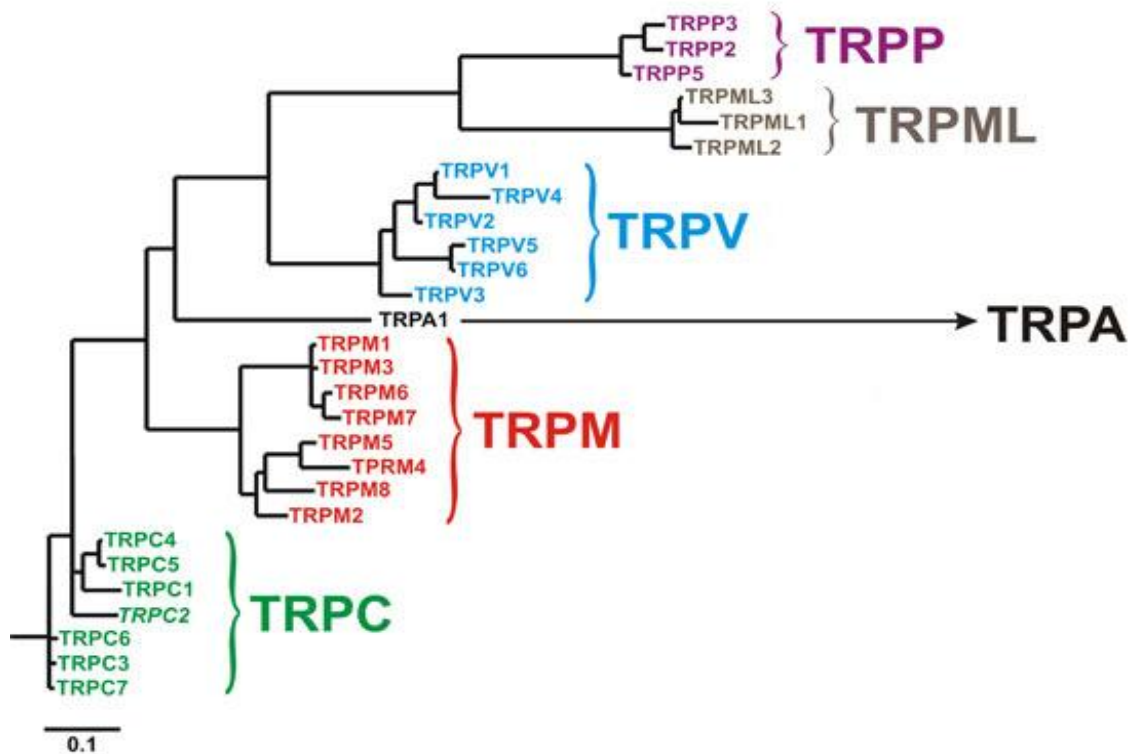
---

#### **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### 4.1. Canais de potencial transitório - TRP

A história dos receptores de potencial transitório (TRP) começa na década de 1960, quando Cosens e Manning (1969) descreveram pela primeira vez a existência de uma variante mutante de *Drosophila melanogaster* que se apresentava cega. Analisando seu sistema visual, foi observado que o fotorreceptor apresentava uma resposta transiente à estimulação luminosa prolongada, enquanto que o fotorreceptor normal apresentava uma resposta contínua. Vinte anos após esta descoberta, os pesquisadores Montell e Rubin (1989) descreveram a presença de uma proteína composta por 1275 aminoácidos dispostos em aproximadamente oito segmentos transmembrana, sem homologia a outros receptores descritos até então. Posteriormente foi encontrado o gene que codificava esta proteína, denominado *trp-like* (*trpl*), e observado que esta proteína apresentava homologia com a região do sensor de voltagem de alguns canais de cálcio, indicando que este gene codificasse subunidades de um canal permeável a cálcio (Phillips *et al.* 1992).

A primeira homologia para o TRP descrito em vertebrados foi feita na década de 1990, quando Peterson e colaboradores (1995) descreveram a existência de TRP em oócitos de *Xenopus* e também em camundongos. Posteriormente, Wes e colaboradores (1995) também identificaram uma proteína homóloga ao TRP em humanos, e este foi denominado TRPC1 (canônico). Esta primeira descoberta impulsionou a pesquisa por outras proteínas e canais homólogos do TRP em humanos e outras espécies. Até hoje, já foram descritos isoformas TRP em 29 vertebrados, divididos inicialmente em três subfamílias (C – canônico V - vanilóide e M – melastatina; Harteneck *et al.* 2000), e posteriormente em outras 4 subfamílias (P – policistina, ML – mucolipina, A – anquirina, N – não sensível a estímulo mecânico C; Clapham, 2003).



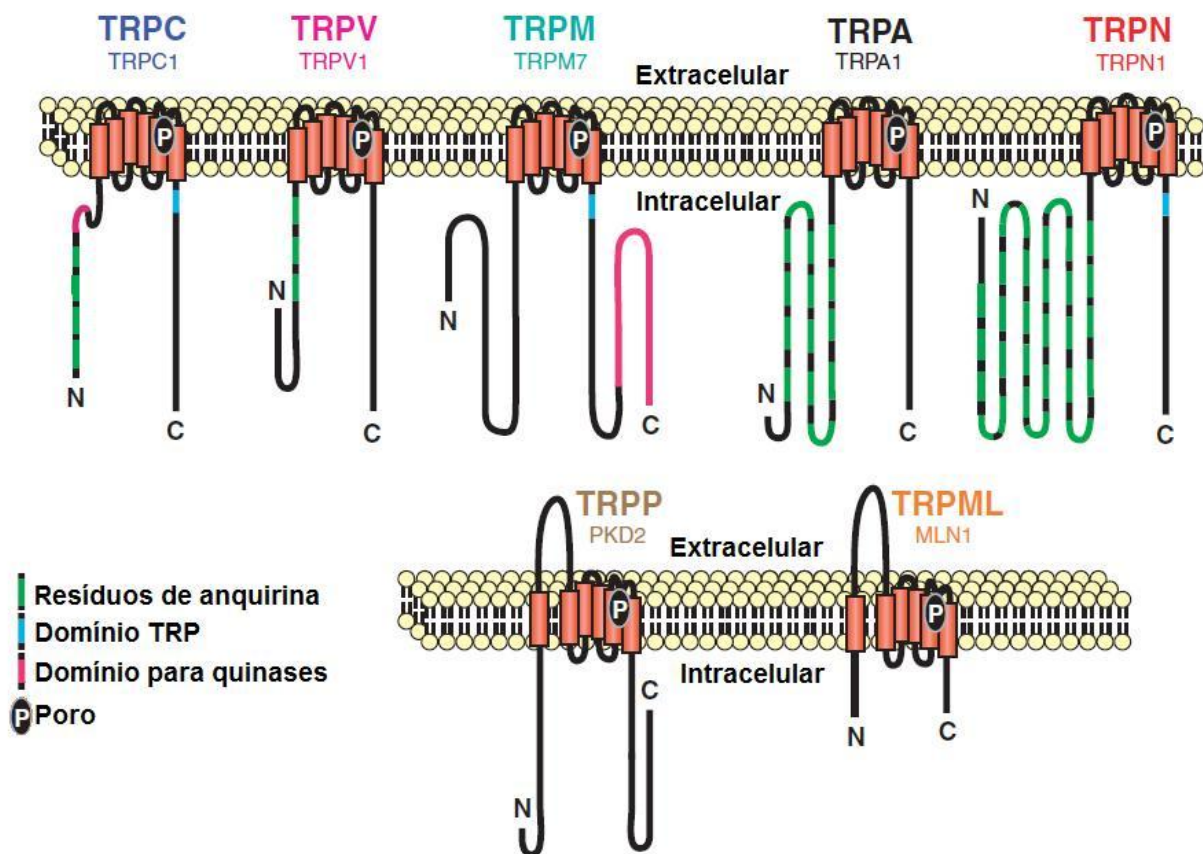
**Figura 1:** Divisão das subfamílias dos canais TRP. Adaptado de Peters et al/ Science STKE, 2005.

Atualmente, compreende-se que os receptores de potencial transitório (TRP) são uma família de canais iônicos com a capacidade de permear cátions, principalmente cálcio. Apesar das teorias iniciais descreverem a existência de oito domínios transmembrana, técnicas de imagem por microscopia eletrônica e bioquímica demonstraram que na verdade, os canais TRP são formados por seis domínios transmembrana com a região formadora do poro entre as regiões cinco e seis, e a região sensor de voltagem entre as regiões um e quatro (Latorre *et al*, 2009). A cauda C e N terminal apresentam-se voltadas para o lado intracelular, com caráter fortemente hidrofóbico (Figura 2) (Gaudet, 2009).

A região C terminal apresenta variação dentre os diferentes tipos de canais TRP, apresentando diferentes sítios e também uma região conservada (domínio TRP ou *TRP box*). Esta última região apresenta-se conservada em 11 das 13 isoformas conhecidas em mamíferos atualmente, sendo utilizada como marcador para o rastreamento destes canais. Além disso, alguns canais ainda apresentam sítio de ligação para calmodulina, como o TRPV, ou domínios enzimáticos, como os

TRPM (Zhu, 2005). Acredita-se também que estes canais possam se apresentar como homômeros tetraméricos (Strübing *et al.*, 2001).

A região N terminal apresenta-se formada por uma série de resíduos de anquirina, presente na maioria dos canais TRP. Estes resíduos estão dispostos como tijolos empilhados, formando uma superfície estável e rígida para o acoplamento de diversas proteínas ao receptor. Além disso, estes domínios servem como âncoras para o transito do receptor de vesículas até a membrana plasmática, e também para a sua estabilização com a mesma e o cito esqueleto celular. Para alguns receptores, como os TRPVs, alterações nesta região implicam em uma não funcionalidade do mesmo (Montell *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Representação espacial da estrutura das diferentes famílias de receptores TRP. Adaptado de Montell / Science's STKE: signal transduction knowledge environment, 2005.

A maioria dos TRPs age como sensores fisiológicos a estímulos externos, sejam estímulos térmicos, químicos (variações de pH e osmolaridade), sonoros ou

luminosos. Apesar disso, também são capazes de responder a uma gama de substâncias endógenas como lipídios, nucleotídeos, produtos do estresse oxidativo e açúcares (Jara-Oseguera *et al.*, 2008). Apesar dessas diferenças, os canais TRP, com exceção do TRPM4/5, possuem como função controlar a concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular. Com isso, a ativação destes canais leva a ativação de uma série de enzimas sensíveis a cálcio, como óxido nítrico sintase (NOS) e outras enzimas do tipo quinase, bem como transcrição gênica (Tai *et al.*, 2007).

Apesar de se localizarem principalmente na membrana celular, alguns TRP podem ainda ser encontrados em algumas organelas, como retículo endoplasmático e mitocôndria (Nelson *et al.*, 2010).

## **4.2. Receptor de potencial transitório vanilóide 1 – TRPV1**

### **4.2.1. Caracterização histórica**

Desde 7000 a.C., diferentes preparações de plantas e produtos naturais são utilizadas para o tratamento de diferentes sintomas e doenças. Classicamente, sabe-se que o extrato da pimenta vermelha, quando aplicado topicamente provoca vermelhidão, inchaço e dor, muitas vezes descrita como queimação. Além desses aspectos negativos, aplicações repetidas desse extrato levavam a perda de sensibilidade dolorosa, o que muitas vezes culminou na aplicação do extrato como tratamento para diferentes tipos de dores. Apesar disso, o mecanismo pelo qual isso ocorria permanecia incerto (Calixto *et al.*, 2005).

Pesquisando pelos componentes ativos dessa preparação, em 1846 foi isolado pela primeira vez a substância responsável pela pungência da pimenta, bem como pelas alterações fisiológicas observadas após a aplicação deste extrato de pimenta, que foi denominada capsaicina. Em 1919, foi descrito pela primeira vez a estrutura química e o processo de síntese da capsaicina (N-vanillilnonanamide) (Para revisão do histórico de uso da capsaicina ver Calixto *et al.*, 2005).

Buscando pelos mecanismos biológicos pelo qual a capsaicina apresentava seus efeitos, Jancsó *et al.*, 1977 observaram que a capsaicina era capaz de promover a ativação de algumas populações de neurônios em culturas de células,



mas não de todos de uma forma geral. Isso sugeriu a existência de um alvo específico para a capsaicina. A partir dessa observação, foi sugerida a existência de um receptor específico para esta substância que foi denominado receptor vanilóide (VR), devido ao grupamento vanilóide presente na capsaicina (Szolcsanyi e Jancso-Gábor, 1975). A partir dessa proposta, vários experimentos foram realizados para o isolamento do VR, usando diferentes radioligantes, entre eles dihidrocapsaicina, um análogo estrutural hidrossolúvel da capsaicina (James *et al.*, 1988). Apesar disso, estes estudos não obtiveram sucesso, devido à relativa baixa potência da capsaicina e seus análogos, e também devido a sua hidrofobicidade.

Apesar disso, Szallasi e Blumberg (1989) caracterizaram os efeitos descritos a partir da aplicação de resiniferatoxina (RTX), extraída da planta *Euphorbia resinifera* (Euphorbiaceae) como sendo devido à ativação do VR. Até então, esperava-se que a RTX agisse como outros ésteres de forbol, agindo através da ativação de proteínas quinase. Ao contrário do que se esperava, esta substância não apresentava os grupos químicos necessários para isso (Driedger e Blumberg, 1980). Concomitantemente, a RTX era capaz de induzir alterações fisiológicas semelhantes às observadas após a aplicação de capsaicina (hipotermia, dor, inflamação neurogênica), além de apresentar um grupo homovanilil, presente também na capsaicina. Posteriormente foi demonstrado que a RTX é também um possível ligante do receptor VR, aproximadamente vinte vezes mais potente e com maior hidrofobicidade que a capsaicina. Essa descoberta possibilitou a síntese de um radioligante com características químicas próprias para o desenvolvimento de um ensaio de união específica (Szallasi e Blumberg, 1990). Esse dado permitiu mapear a distribuição do VR em diferentes tecidos, como medula espinhal, gânglio da raiz dorsal (DRG) epitélio urogenital, mucosa nasal e do cólon de diferentes espécies, como ratos, camundongos e humanos (Szallasi e Blumberg, 1991; Szallasi *et al.*, 1993).

O próximo marco na história do VR se deu no final da década de noventa, quando o grupo de pesquisadores liderados por David Julius iniciou a busca pelo gene que codificava o VR. Para isso, foi inicialmente isolado o DNA complementar (cDNA) da proteína responsável pela ligação da capsaicina. Posteriormente, células eucarióticas foram transfectadas com diferentes fragmentos do DNA de neurônios de ratos responsáveis a capsaicina, separados em diferentes grupos (*pools*). Utilizando ensaios de imagem para  $Ca^{++}$  intracelular, foram selecionadas as

linhagens tranfectadas responsivas a capsaicina. Após, os *pools* utilizados nessas linhagens foram novamente divididos em *pools* menores e novamente tranfectados em células eucarióticas. Esse processo foi repetido até o isolamento de um único gene responsável pela proteína com afinidade pela capsaicina, que promovia o aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ . Este gene codificava uma proteína composta por 838 aminoácidos com uma estrutura semelhante ao dos receptores TRP, que promovia uma corrente de membrana e dessensibilização dependente de  $\text{Ca}^{++}$  (Caterina *et al.*, 1997). A partir desse ponto, o até então chamado receptor vanilóide (VR) passou a integrar a família dos TRPs, formando um novo subtipo – vanilóide, sendo assim chamado TRPV1.

#### **4.2.2. Aspectos gerais**

O canal TRPV1 é formado por seis domínios transmembrana e um prolongamento hidrofóbico formador do poro, localizado entre as regiões cinco e seis. Similarmente aos demais receptores TRP, o TRPV1 provavelmente forma um homotetrâmero funcional, onde todos os monômeros contribuem para a formação do poro e seletividade do canal (Tominaga *et al.*, 2005; Ferrer-Montiel *et al.*, 2004). Atualmente, sua expressão já foi descrita em diferentes tecidos, como todos os gânglios sensoriais (DRG, trigeminal e vagal) e fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$ . Todas essas fibras são peptidérgicas, contendo diferentes neurotransmissores, como substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Caterina *et al.*, 1997, Szallasi e Blumberg, 1999). O TRPV1 também pode ser encontrado no sistema nervosa central (SNC) e outros tecidos não neuronais, como queratinócitos, mastócitos, folículo capilar, células musculares lisas, bexiga, fígado, rim, baço e pulmão (Sokabe e Tominaga, 2009).

Fisiologicamente, este receptor é responsável pelo reconhecimento de várias modalidades de estímulos nocivos, como aumento de temperatura ( $>43^{\circ}\text{C}$ ), diminuição do pH ( $< 5.2$ ) (Caterina *et al.*, 1997). Até recentemente, não era claro como alterações de temperatura eram capazes de promover a ativação do receptor TRPV1. Recentemente foi proposto que a região distal da cauda C terminal é responsável pelo reconhecimento deste tipo de estímulo (Vlachova *et al.*, 2003).

Este receptor também pode ser ativado por diferentes substâncias químicas produzidas no organismo, de modo geral lipídios, como anandamida, ácido 12-hidroperoxi-eicosatetraenóico (12-HPETE), N-araquidonoil dopamina (NADA) e metabólitos do ácido linoléico oxidado (Hwang *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2009; Patwardhan *et al.*, 2010), e diferentes lipídios, como prostanóides e anandamida (Jara-Oseguera *et al.*, 2008). Essa característica é muito importante do ponto de vista farmacológico, pois o sítio de ligação vanilóide está localizado na face intracelular do receptor. Assim, é necessário que as substâncias apresentem lipofilicidade suficiente para atravessar a membrana plasmática e interagir com o sítio. No TRPV1 de roedores, existem sítios de ligação para estas substâncias tanto na cauda N terminal (Arg114) quanto na C terminal (Glu761) (Jung *et al.*, 2002). Além disso, outros sítios, como a Tyr511 localizado no domínio transmembrana quatro é necessário para a atividade da capsaicina, enquanto a Met547 é necessária para a atividade da RTX. Outros domínios também são necessários para a atividade de diferentes agonistas lipofílicos, como Thr550 (grupo vanilil), Trp549 e Ser512 (Chou *et al.*, 2004).

O receptor TRPV1 apresenta 18 resíduos de cisteína em sua seqüência primária, o que levou diferentes grupos a pesquisar por possíveis modulações redox de sua atividade. Neste âmbito, já foi descrito que agentes redutores como a glutathione e o ditioteriol (DTT) são capazes de promover uma diminuição do limiar de ativação do receptor a temperaturas. Mutações sítio-dirigido para a Cys621 identificaram um sítio de modulação redox extracelular, principalmente para agentes redutores. Apesar disso, já foi demonstrado que alguns agentes oxidantes, como a cloramina-T, e agentes alquilantes são também capazes de promover uma diminuição no limiar de ativação térmico do receptor TRPV1 (Susankova *et al.*, 2006). A partir desses dados, é possível supor que o receptor TRPV1 também se apresente como um sensor do estado redox da célula, explicando a sua participação em diferentes patologias, como isquemia e inflamação, nos quais já foi evidenciado o desenvolvimento de estresse oxidativo (Lakhan *et al.*, 2009; Mirshafiey *et al.*, 2008).

Além de atuar como um importante receptor para diferentes tipos de estímulos endógenos e exógenos, o TRPV1 também pode ser modulado por substâncias químicas derivadas de diferentes produtos naturais (Calixto *et al.*, 2005). O maior exemplo disso são a capsaicina e a RTX, agonistas deste receptor que

possibilitaram sua caracterização e seqüenciamento. Além destes ligantes, outros já foram descritos também, e são responsáveis pelas características sensoriais apresentadas por diferentes tipos de alimentos e resinas. Abaixo é descrito uma série de compostos isolados de plantas que agem sobre o receptor TRPV1, tanto de forma agonista quanto antagonista (Tabela 1).

#### Ligantes de origem natural de receptor TRPV1

<b>Classe</b>	<b>Composto</b>	<b>Origem</b>	<b>Atividade</b>
Capsaicinoides	Capsaicina	<i>Capsium sp.</i>	Agonista
	Capsiato	<i>Capsium sp.</i>	Agonista
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Agonista
	Eugenol	<i>Ostissimum grastissimum</i>	Agonista não seletivo
Forbol	RTX	<i>Euphorbia resinifera</i>	Agonista
Ácidos graxos	Ácido ricinoléico	<i>Ricinus communis</i>	Agonista
Ginsenosídeos	Ginsenosídeo	<i>Panax ginses</i>	Agonista antagonista misto
Canabinoides	Canabinal	<i>Cannabis sativa</i>	Agonista
Dialdeídos	Drimanial	<i>Drimis winteri</i>	Agonistas não seletivos
	Polygodial	<i>Polygonum hydropiper</i>	Agonistas não seletivos
Outros Terpenos	Tapsigargina	<i>Thapsia garganica</i>	Antagonista não seletivo
	Isoveleral	<i>Lactarius vellereus</i>	Agonista antagonista misto
Gingerol	[8]-Gingerol	<i>Zingiber officinale</i>	Agonista não seletivo
	[6]-Gingerol	<i>Zingiber officinale</i>	Agonista não seletivo

**Tabela 1:** Produtos naturais com afinidade pelo receptor TRPV1, classificados de acordo com sua origem. Adaptado de Calixto et al. / Pharmacology & Therapeutics (2005).

### 4.2.3. TRPV1 e nociceção

Dor é a denominação dada à sensação física ou emocional provocada por uma estimulação desagradável ou lesiva ao organismo. Fisiologicamente, a dor possui um caráter protetor importante, indispensável à manutenção da integridade física (dor nociceptiva). Apesar disso, em algumas condições, a dor torna-se desnecessário, seja por sua intensidade ou duração, caracterizando uma condição patológica por si só. Os componentes sensoriais da dor são denominados nociceção e inclui o processo de reconhecimento e detecção do estímulo, a geração de um potencial de ação a partir dessa estimulação e a transmissão dessa informação até os centros de reconhecimento da dor. Além disso, em condições patológicas podem ocorrer alterações na capacidade de percepção de estímulos nocivos, fazendo com que estímulos inócuos sejam percebidos como nocivos (alodínia) ou desenvolvendo uma sensibilidade aumentada a estímulos dolorosos (hiperalgesia) (Loeser e Treeder, 2008).

Na periferia do organismo encontram-se terminações nervosas livres denominadas nociceptores. Estas terminações são formadas por axônios provenientes dos gânglios da raiz dorsal (DRG), formando em sua maioria fibras do tipo A $\delta$  e C. Nestas terminações nervosas livre encontra-me uma diversidade de receptores capazes de reconhecer diferentes tipos de estímulos, sejam estes de ordem mecânica, química ou térmica. Uma vez que este estímulo nocivo seja reconhecido pelo nociceptor, é gerado um potencial de ação que será transmitido até a medula espinhal, principalmente até as lâminas superficiais (I e II) do corno dorsal. Neste local ocorre então a integração das diferentes modalidades de estímulos nocivos oriundos da periferia do organismo e a organização de uma resposta reflexa a este. Esta resposta é desencadeada de forma involuntária com o intuito de afastar o membro afetado da fonte geradora do estímulo (Scholz e Wolf, 2002).

Uma vez realizado este processo, é possível que ocorra a geração de uma resposta reflexa a esta estimulação nociva, com o intuito de afastar o membro afetado da fonte de estímulo. Além disso, este sinal também é enviado a centros supra-espinhais, como tálamo, amígdala e córtex frontal, onde estes estímulos serão devidamente reconhecidos e discriminados como tal (Hunt e Mantyh, 2001).

Tanto periféricamente, no nociceptor, quanto centralmente, na medula espinhal, um dos principais receptores e realizar o reconhecimento e integração dos estímulos nociceptivos é o TRPV1. A expressão deste receptor já foi observada nos terminais dos aferentes primários, onde apresenta a função de detectar diferentes modalidades de estimulação, como elevação nociva da temperatura e também reagir à presença de alguns irritantes químicos (Immke e Gavva, 2006). Além disso, já foram identificadas projeções vagas responsivas a capsaicina inervando diferentes órgãos (Zhao *et al.*, 2009). Utilizando diferentes métodos de inativação do TRPV1, tanto por ablação gênica quanto por dessensibilização do receptor, é possível observar alterações na capacidade de percepção de diferentes estímulos, bem como no limiar da dor, reforçando a importância do receptor TRPV1 da detecção da dor (Schumacher, 2010).

Apesar de sua clara importância periférica, já foi demonstrado que o TRPV1 participa do processo de integração e transmissão espinhal da dor. Isso foi inicialmente observado pela presença de imunoreatividade contra este receptor nas lâminas superficiais da medula espinhal. Além disso, expressão do receptor já foi observada também no núcleo trigeminal e DRG (Tominaga *et al.* 1998)

Reforçando este fato, ensaios farmacológicos demonstram o efeito de antagonistas em ambos os sítios (periféricamente e centralmente), em diferentes modelos animais e também em humanos (Gavva *et al.*, 2008). Estudos recentes demonstraram a participação deste receptor em diferentes condições patológicas na qual a dor apresenta-se com um dos principais sintomas. Tanto em humanos quanto em roedores, foi observado que a dessensibilização com capsaicina é capaz de promover uma diminuição da dor apresentado em quadros inflamatórios crônicos e neuropáticos (Szabó *et al.*, 2005). Nesses processos, sabe-se que a ativação V1 é responsável não só pelo desenvolvimento de dor espontânea, mas também de alguns distúrbios sensoriais da dor apresentados pelos pacientes, como alodínia (reconhecimento de estímulos inócuos como nocivos) e a hiperalgesia (percepção exagerada da dor) (Knotkova *et al.*, 2008).

### 4.3. Estresse Oxidativo

#### 4.3.1. Fontes geradoras de espécies reativas

Durante os processos metabólicos, a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons produz energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Durante esse processo, a mitocôndria consome oxigênio molecular ( $O_2$ ) como acceptor final para os elétrons transportados durante a cadeia de transporte de elétrons. Apesar disso, cerca de 5% de todo o oxigênio fica incompletamente reduzido, originando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Este apresenta um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, o que o torna uma espécie reativa (ER), podendo interagir com outros componentes celulares (Murphy 2009).

Além da mitocôndria, outras fontes podem formar o ânion superóxido, dentre estas, as enzimas NADPH oxidase. Esta enzima é composta por um complexo protéico dividido em sete subunidades divididas em dois complexos: um ancorado a membrana plasmática e outro no citoplasma. Quando ocorre a fosforilação do complexo citosólico, esse migra para a membrana, acoplado-se ao complexo da membrana. Nesta conformação, a enzima passa a sua forma ativa e promove a oxidação do  $O_2$  a  $O_2^-$  à custa de adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Outra enzima produtora de  $O_2^-$  é a xantina oxidase. Esta enzima promove a oxidação da xantina a ácido úrico, e conseqüente, no processo ocorre oxidação do  $O_2$  a  $O_2^-$  (Shibata e Kobayashi, 2008).

Outra ER formada no organismo é o gás óxido nítrico (NO), formado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) através da conversão de L-arginina em L-citrulina, com a conseqüente liberação de NO. Esta ER difere das demais por apresentar seu elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio, e não no átomo de oxigênio como as demais. Da mesma forma, como as demais ER, o NO é capaz de interagir com uma diversidade de alvos, como resíduos de cisteína (nitração protéica), promovendo alteração ou perda da função celular. Além disso, o NO é capaz de reagir diretamente com o  $O_2^-$ , formando o radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Beckman *et al.*, 1990). Da mesma forma, esta ER pode promover alterações em diversas proteínas, interagindo com resíduos de tirosina, formando 3-nitrotirosina (3-NT; nitrosinação protéica) (Cenini *et al.*, 2008).

### 4.3.2. Estresse oxidativo

Apesar de serem formadas durante a atividade celular normal, é de extrema necessidade que a célula seja capaz de manter as ERs em níveis controlados, pois estas podem interagir com diferentes tipos de biomoléculas (ácidos nucleicos, lipídios e proteínas), promovendo alteração em sua funcionalidade. Devido a isso, os sistemas celulares desenvolveram uma série de mecanismos para neutralizar esta espécie, convertendo-a em outras moléculas menos reativas. Nos mamíferos, existe uma série de mecanismos desenvolvidos com o intuito de promover a neutralização ou diminuição da reatividade destes produtos formados. Estes mecanismos são compostos tanto por diferentes tipos de substâncias que são capazes de promover uma redução direta dessas substâncias quanto por sistemas enzimáticos (Valko *et al.*, 2006). Dentre os sistemas enzimáticos, a primeira linha de defesa são as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione oxidase (GOx), que convertem o ânion superóxido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Apesar de apresentar uma menor reatividade, o  $H_2O_2$  pode ainda interagir com biomoléculas, além de ser clivado na presença de metais divalentes, como o  $Fe^{++}$ , formando o radical hidroxil (-OH). Devido a isso, existe uma segunda linha de defesa contra ERs, formada pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que promovem a redução do  $H_2O_2$  à água (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Além das defesas enzimáticas, nosso organismo apresenta uma série de compostos capazes de neutralizar ER de forma independente de enzimas. Dentre estas, destacam-se os compostos tiólicos não-protéicos, como a glutathione (Moran *et al.*, 2001). Este composto tiólico é formado por três aminoácidos, glutamato, cisteína e glicina, representa a maior parte dos mecanismos antioxidantes não enzimáticos das células, além de atuar como substrato para atividade antioxidante de alguns sistemas antioxidantes, como a GOx e GPx. Além da glutathione, outras substâncias podem agir de forma similar, como o ácido ascórbico (vitamina C) e também a vitamina E, sendo que esta representa a maior defesa antioxidante dos compartimentos lipofílicos, como membranas plasmáticas (Jialal *et al.*, 2002).

Apesar da existência de um grande arsenal de substâncias e sistemas capazes de neutralizar estas espécies, em algumas situações patológicas pode ocorrer um desequilíbrio neste balanço. Nestas situações, seja pela perda da capacidade de neutralizar as ERs formadas ou por sua produção excessiva, as ERs



podem interagir com diferentes tipos de biomoléculas como proteínas e lipídios. O processo químico de oxidação pode provocar diversos tipos de alteração, desde um ganho ou perda de função até a inativação total de sua funcionalidade. A esse grupo de alterações funcionais causadas pela perda de controle sobre as ERs chama-se estresse oxidativo (Starkov, 2008). Um exemplo das conseqüências deletérias dessas alterações é o desencadeamento de necrose/apoptose celular conseqüente da danificação do material genético ou de organelas como a mitocôndria e a inativação de enzimas vitais ao funcionamento celular, como a SOD (Norberg et al., 2010; Yamakura et al., 1998). Além disso, o processo de oxidação não enzimático de algumas substâncias, como ácidos graxos e lipídios de membrana, promove a formação de vários compostos intermediários, como diferentes tipos de peróxidos orgânicos (radical peroxil), e também produtos finais, em sua maioria aldeídos reativos como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e malonildialdeído (MDA). Ao contrário do que se achava antigamente, hoje se sabe que estas substâncias não são meros produtos secundários ao estresse oxidativo, e sim compostos biologicamente ativos. Já foi demonstrado que 4-HNE é capaz de atuar em diferentes alvos, como receptores de membrana alterando a sua função ou agindo como agonistas endógenos (Roede e Jones, 2010).

#### Principais Espécies Reativas Produzidas Fisiologicamente

<i>Espécie reativa</i>	<i>Características</i>	<i>Fontes Produtoras</i>
Ânion superóxido $\bullet\text{O}_2^-$	- Estado de redução univalente do $\text{O}_2$ - Oxidação de ferroproteínas	Cadeia de transporte elétrons Xantina oxidase NADPH oxidase
Peróxido de hidrogênio $\text{H}_2\text{O}_2$	- Estado divalente do $\text{O}_2$ - Lipossolúvel	Superóxido dismutase Glutationa oxidase
Radical hidroxil $\bullet\text{OH}$	- Estado de redução trivalente - Elevada reatividade	Reação de Fenton Decomposição do peroxinitrito.
Radical peroxil $\text{RO}\bullet$	- Radical orgânico	Peroxidação lipídica
Óxido nítrico $\text{NO}\bullet$	- Gás reativo - Rápida difusão - Baixo tempo de meia vida	Óxido nítrico sintase Redução dos estoques de nitrato/nitrito
Peroxinitrito $\text{OONO-}$	- Gás de elevada reatividade - Rápida difusão - Baixo tempo de meia vida	Formado pela entre o $\bullet\text{O}_2^-$ e o $\text{NO}\bullet$

**Tabela 2:** Produção e características das principais espécies reativas formadas no organismo.

### 4.3.3. Estresse oxidativo e nocicepção

O desequilíbrio do estado redox celular, caracterizado como estresse oxidativo já foi observado em diferentes tipos de estados patológicos, como artrite reumatóide, lesão da isquemia-reperfusão, diabetes, bem como nas doenças de Alzheimer e Parkinson. Nestes quadros, as ERs foram apontadas como mecanismos de lesão celular, bem como mantenedoras do processo patológico. Da mesma forma, foi evidenciado que o tratamento com substâncias antioxidantes promove uma melhora do quadro clínico em humanos, bem como em modelos animais (Perez *et al.*, 2003; Hacimuftuoglu *et al.*, 2006). Um dos principais processos em que vem se observando uma grande participação destas ERs é na transmissão da dor.

A participação de ERs na produção da dor foi inicialmente evidenciada em estudos *in vitro*, onde o  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e  $-OH$  estimularam nociceptores (terminações periféricas livres de fibras sensoriais sensíveis a estímulos nocivos) cardíacos e cutâneos, especialmente após isquemia ou aplicação de mediadores inflamatórios (Kress *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento sistêmico com antioxidantes reduz a nocicepção produzida por diferentes estímulos agressivos (Guedes *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Além do papel periférico, a participação central das espécies reativas também já foi evidenciada através da administração intratecal de antioxidantes e observação de seu efeito antinociceptivo (Wang *et al.*, 2004, Rossato *et al.*, 2010).

Na transmissão da dor, a medula espinhal atua como um centro de integração dos estímulos nocivos periféricos, bem como moduladora desses eventos (Scholz e Woolf, 2002). A participação das ERs neste local demonstra um papel importante como possíveis moduladores da transmissão da dor em nível central/espinhal. Já observamos que durante a estimulação nociva ocorre uma diminuição dos níveis de tióis não protéicos nesse sítio, bem como um aumento destes níveis promove um aumento da resistência à dor (Rossato *et al.*, 2010). Apesar disso, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais as ERs atuam neste processo.

Um possível alvo molecular sensível a modulação mediado por espécies reativas são os transportadores de glutamato (EAAT). Já foi previamente descrito na literatura que espécies reativas de oxigênio (anion superóxido) bem como espécies reativas de nitrogênio (peroxinitrito) podem reagir com o EAAT, principalmente dos subtipos 1 e 2 (EAAT1-2; Chen *et al.*, 2010). Nestes casos, ocorre uma diminuição

na atividade do transportador, promovendo um acúmulo de glutamato na fenda sináptica, aumentando a concentração de glutamato na sinapse, promovendo um aumento na ativação dos receptores glutamatérgicos. Dentre estes, destaca-se o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), um canal iônico formado por quatro subunidades formando um poro permeável por cátions, principalmente cálcio. Além do sítio de ligação para seus agonistas glutamato e glicina, diferentes subunidades ainda apresentam outros sítios de modulação, incluindo um sítio redox. Já foi demonstrado que a modulação deste sítio é capaz de alterar a capacidade do canal de promover o influxo de cálcio (Scatton, 1993). Por isso, o receptor NMDA também se mostra como um possível alvo para a modulação exercida por espécies reativas.

Além disso, já foi demonstrado que a ativação dos receptores glutamatérgicos, principalmente do receptor NMDA é capaz de promover um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Hardingham, 2009). Desta forma, o receptor NMDA poderia apresentar como uma de suas vias de sinalização a produção de espécies reativas, para assim promover uma estimulação dolorosa. Apesar disso, as fontes produtoras de espécies reativas mediadas pela ativação NMDA ainda não foram descritas, bem como seus alvos moleculares.

Outro possível alvo desta modulação seria o receptor TRPV1, que se encontra distribuído tanto pela periferia do organismo quanto na medula espinhal. Este receptor, ao ser ativado promove um influxo de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Na}^+$ , levando à liberação de neurotransmissores como o glutamato e substância P, entre outros (Caterina *et al.*, 1997). O TRPV1 já foi indicado como um promotor do aumento de ERs durante vários eventos, como a nocicepção. Ademais, já foi demonstrado que este receptor parece ser o responsável pela ativação de nociceptores mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e possui resíduo de cisteína que pode interagir tanto com espécies de oxigênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ), quanto com espécies de nitrogênio (NO) (Yoshida *et al.*, 2006).

Assim sendo, a modulação deste receptor por vias oxidativas apresenta um novo mecanismo pelo qual substâncias exógenas podem ser utilizadas. Um exemplo disso seria a utilização de antioxidantes em quadros de dor patológica para impedir a ativação excessiva deste receptor e assim conseguir contornar ou amenizar estes quadros.

#### 4.4. Eriodictiol

Produtos naturais, principalmente de plantas utilizadas na medicina popular, têm sido utilizados como para o tratamento de diversas doenças e para o alívio da dor por mais de cinco milênios em diferentes civilizações. Atualmente busca-se nestes produtos naturais, tanto em extratos de diferentes partes da planta como em suas frações, compostos quimicamente purificados que sejam capazes de desencadear estes efeitos descritos pela medicina popular. Estes compostos são utilizados diretamente como medicamentos ou então como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre estes compostos destacam-se fármacos utilizados atualmente como a morfina, extraída do látex da papoula. Apesar de possuir sua síntese química descrita, até é realizado o processo de extração do produto natural por se mostrar mais viável e rentável (Calixto *et al.*, 2005).

Apesar de a morfina ser o mais conhecido fármaco utilizado para o tratamento da dor de origem natural, são inúmeras as descrições de plantas em diferentes preparações utilizadas para o combate da dor (Walker *et al.*, 2008). Dentre estas, pode-se destacar a planta *Vernonia tweedieana*, conhecida popularmente como assa-peixe, língua-de-vaca, chamarrita, erva-de-mula, orelha-de-mula, mata-pasto, laguneira, comum na região sul do Brasil, Paraguai na Argentina (Cabrera e Klein, 1980). Essa planta é utilizada popularmente para o tratamento de distúrbios respiratórios e processos inflamatórios na forma de chá. A partir de suas folhas, diferentes compostos bioativos já foram descritos, dentre estes o flavonóide eriodictiol (3', 4', 5, 7, dihidroxiflavona).

Devido a sua presença em diferentes plantas utilizadas na medicina popular, e também pela sua presença em algumas frutas cítricas como o limão, diferentes estudos já foram realizados para descrever o seu processo de metabolização e excreção em humanos e roedores. Sabe-se que este composto pode ser encontrado em sua forma livre ou como quatro diferentes isômeros C-glicosilados (Stalmach *et al.*, 2009). Uma vez absorvidos intestinalmente, estes podem ser então ser convertidos em sua forma aglicona e futuramente metabolizados por metilação, originando os flavonóides hesperitina e homoeriodictiol, ou por conjugação ao ácido glicurônico. Além disso, pode ser degradado pela flora intestinal formando o ácido 3,4-dihidroxi-hidro cinâmico (Miyake *et al.*, 2000).

---

Como é característica dos compostos da classe dos flavonóides, diferentes estudos já descreveram a atividade antioxidante do eriodictiol, mostrando a sua capacidade de neutralizar desde espécies reativas artificial, como o DPPH (Narváez-Mastache *et al.*, 2008). Além disso, sabe-se também que o eriodictiol é capaz de inibir com outros sistemas formadores de espécies reativas, como a enzima xantina oxidase (Tan *et al.*, 2009), e promover a ativação do fator de transcrição Nrf2, responsável por promover a transcrição de proteínas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo, como as enzimas do sistema glutathione (Johnson *et al.*, 2009). Através desta atividade antioxidante, várias outras ações biológicas já foram propostas e descritas, como atividade antiinflamatória em diferentes modelos animais (Clavin *et al.*, 2007). Outros efeitos também já foram descritos, como atividade vaso-relaxante, apesar de seu mecanismo não ser completamente compreendido (Ramón Sánchez de Rojas *et al.*, 1999).

Recentemente, nosso grupo identificou similaridades estruturais entre a molécula do flavonóide eriodictiol e de outro composto natural, a capsaicina, principio ativo pungente da pimenta vermelha. Nesta análise identificamos uma região bioisostérica entre as duas moléculas (Introdução, figura 1) em regiões responsáveis por conferir afinidade ao sítio vanilóide do receptor TRPV1. Dessa forma surge a possibilidade de que o eriodictiol também seja capaz de interagir com este receptor e assim, de alguma forma, exercer uma modulação sobre a detecção e transmissão de estímulos nocivos.

---



## **Eriodictyol: a flavonoid antagonist of TRPV1 receptor with antioxidant activity**

Mateus Fortes Rossato<sup>1</sup>, Gabriela Trevisan<sup>1</sup>, Cristiani Isabel Banderó Walker<sup>1</sup>, Jonatas Zeni Klafke<sup>1</sup>, Ana Paula de Oliveira<sup>1</sup>, Jardel Gomes Villarinho<sup>1</sup>, Ricardo Zanon<sup>2</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>2</sup>, Marcus Vinicius Gomez<sup>3</sup>,  
Juliano Ferreira<sup>1,\*</sup>

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica<sup>1</sup>, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas<sup>2</sup>; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular<sup>3</sup>, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*\*Corresponding author: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8031*

*E-mail: ferreiraj99@gmail.com*

**ABSTRACT**

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a calcium permeable channel responsible for the transduction and modulation of acute and chronic pain signaling, being a potential target for treatment of different pain disorders. In spite of that, AMG517, a TRPV1 antagonist, presents several clinical limitations, such as the development of severe hyperthermia. The aim of this study was to investigate the possible interaction of the flavonoid eriodictyol with the TRPV1 receptor and its putative antinociceptive and hyperthermic effect. Eriodictyol was able to displace the [<sup>3</sup>H]-resiniferatoxin binding ( $IC_{50} = 47$  (21 - 119) nM) and to inhibit the calcium influx mediated by capsaicin ( $IC_{50} = 44$  (16 - 125) nM), suggesting that eriodictyol acts as a TRPV1 antagonist. Moreover, eriodictyol induces antinociception in the intraplantar capsaicin test, with maximal effect of  $49 \pm 10$  and  $64 \pm 4\%$  of inhibition for oral ( $DE_{50} = 2$  (1-5) mg/kg) and intrathecal ( $DE_{50} = 2$  (1-3) nmol/site) routes, respectively. Concomitantly, eriodictyol did not induce any alteration on body temperature or locomotor activity. Orally administered eriodictyol (4.5 mg/kg) prevented the nociception induced by intrathecal injection of capsaicin ( $72 \pm 6\%$  of inhibition), the non-protein thiol loss and the 3-nitrotyrosine (3-NT) formation induced by capsaicin in spinal cord. Eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) also reduced the thermal hyperalgesia (100% of inhibition) and mechanical allodynia ( $62 \pm 9\%$  of inhibition) elicited by complete Freund's adjuvant (CFA) paw injection. In conclusion, eriodictyol acts as an antagonist of TRPV1 receptor and an antioxidant, inducing antinociception without some side effects and limitations expected for TRPV1 antagonists, as hyperthermia.

**Keywords:** 3-NT, binding, calcium influx, eriodictyol, pain, TRPV1, thiol.



## 1. INTRODUCTION

The transient receptor potential (TRP) is a super family of ionic channel formed by six transmembrane domains capable of permeating cations, mainly calcium [1]. TRPV1 is a receptor member of the vanilloid subfamily activated by a series of harmful stimuli, such as heat and acidification as well as chemical irritants, such as capsaicin. This receptor is stimulated by a series of endogenous substances, such as anandamide and leucotriene B<sub>4</sub>. Due to this, this receptor has been implicated in a series of inflammatory diseases and neuropathic pain [2, 3].

In fact, it has been demonstrated that TRPV1 antagonists presented great antinociception in several pain models, such as inflammatory and neuropathic pain [4, 5]. Moreover, the genetic ablation of TRPV1 receptor has been also used to demonstrate its importance in pain transmission [6, 7, 8]. However, a recent clinical trial performed in humans using the TRPV1 antagonist AMG517 showed to be unsatisfactory for pain treatment due to the development of some severe side effects, mainly the development of hyperthermia [9]. This way, the search for new compounds that modulate TRPV1 channel and have safe and efficient analgesic effect is necessary.

With this aim, our research group has been running a triage with several natural compounds with structural resemblance to other TRPV1 ligand. In these tests, we selected the flavonoid eriodictyol (3', 4', 5, 7- tetrahydroxyflavanone), which presents some characteristics commonly found in TRPV1 ligand (Figure 1), such as a regions A (vanilyl ring, responsible for the interaction to the vanilloid site) and B (amide bound, responsible for the structural conformation) that are present in capsaicin (a TRPV1 agonist) [10, 11]. Furthermore, eriodictyol also presents

antioxidant effect [12] and some studies have indicated that antioxidant compounds, such as N-acetylcysteine (NAC), induce antinociception in several pain models [13, 14]. These findings suggest that eriodictyol possesses a good potential to exert antinociceptive action.

Thus, the main objective of the present study was to characterize the interaction of eriodictyol with the TRPV1 receptor and evaluate its antinociceptive effect.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

Three-month-old male and female albino Swiss mice (25-35 g) and male Wistar rats (200–300g) bred in our animal house were used in this study. Animals were housed at a controlled temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with a 12 h light/dark cycle, and were provided standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room for at least 1 h before experiments. Each animal was used for only one experiment. The experiments reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals [15] and were approved by the Ethic's Committee of the Federal University of Santa Maria (process numbers 23081.001086/2009-87).

### 2.2. Drug Treatments

To verify the possible systemic antinociceptive effect of eriodictyol, animals were submitted to an oral administration in different eriodictyol doses (1.5 – 13.5 mg/kg, p.o.), dissolved in 5% Tween 80, 20% polyethyleneglycol and 75% saline. For intrathecal treatment (1 – 30 nmol/site, p.o.), eriodictyol stock solution was dissolved in the same vehicle and diluted in PBS to the desired concentration (final concentration of (0.05% Tween 80, 0.2% polyethyleneglycol). The intratecal injection of vehicle did not cause any effect *per se*. The TRPV1 antagonists AMG9810 and SB366791 (10 mg/kg, p.o.) were also tested as positive control [16, 17] were also administered orally, dissolved in the same vehicle (5% Tween 80, 20% polyethyleneglycol and 75% saline). For *in vitro* assay, stock solution of all

compounds were dissolved in ethanol and diluted in PBS. The final concentration of ethanol was not higher than 0.1%.

The procedure for intrathecal (i.t.) administration was based on the technique described elsewhere [18]. Briefly, the intervertebral space between L5 and L6 was punctured directly using a 28-gauge needle attached to a Hamilton micro syringe. A total volume of 5  $\mu$ L was administered intrathecally. Mice were not anesthetized during these procedures. A tail flick was used as an indication that the needle had penetrated the dura.

### **2.3. [<sup>3</sup>H]-Resiniferatoxin Binding Assay**

Once eriodictyol presents structural resemblance to some TRPV1 ligands, we investigated the possibility of eriodictyol to bind at this receptor [10, 11]. To elicit this possibility, we tested eriodictyol on the [<sup>3</sup>H]-resiniferatoxin ([<sup>3</sup>H]-RTX) binding assay carried out as described previously [19]. Briefly, spinal cord rats were homogenized in buffer A (pH 7.4, 5 mM KCl, 5.8 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM CaCl<sub>2</sub>, 137 mM sucrose, and 10 mM HEPES) and centrifuged for 10 min at 1000g in 4°C. The supernatant was further centrifuged for 30 min at 35,000g in 4°C. The resulting pellets were then resuspended in buffer A and frozen until assayed. The binding mixture was made in a final volume of 500 $\mu$ L, containing buffer A (plus 0.25 mg/mL BSA), membranes (0.5 mg/mL), and 2 nM [<sup>3</sup>H]-RTX in the presence or absence of eriodictyol (3 – 300 nM). For the measurement of the nonspecific binding, 100  $\mu$ M nonradioactive RTX were used. The reaction was started by incubating tubes at 37°C for 60 min, and stopped by transferring the tubes to ice bath and adding 100  $\mu$ g of bovine  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (to reduce nonspecific binding). Finally, the bound and free membranes [<sup>3</sup>H]-RTX were separated by centrifuging for 30 min at 35,000g in

4°C. The pellet was used to quantify the scintillation counting. Specific binding was calculated as the difference of the total and nonspecific binding and the results were measured as % of specific binding.

#### **2.4. Calcium Influx Assay**

Once we evaluated the ability of eriodictyol to bind on TRPV1 receptor, we also estimated its capacity to change calcium influx by TRPV1 receptor. Synaptosomes were prepared from rat spinal cord samples and incubated with Fura 2-AM (10  $\mu$ M) for 30 min at 37°C. After, the reaction was diluted to 1.5 mL (5 mg/mL of protein) with Krebs-Ringer medium ( $\text{Ca}^{2+}$  free) and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by centrifugation (30 s at 12000 xg) and the final pellet was resuspended in 1.5 mL Krebs-Ringer medium ( $\text{Ca}^{2+}$  free). To start the reaction, 1.5  $\mu$ L of 1 M  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) plus different concentrations of eriodictyol (3 – 100) were added, followed by the addition of capsaicin (20  $\mu$ M). We measured  $\text{Ca}^{2+}$  influx by monitoring the fluorescence at 505 nm from excitation at 382 nm in a spectrofluorimeter (RF-5301 PC, Shimadzu). Background fluorescence from an equivalent sample of synaptosomes not loaded with fura 2-AM was recorded at the beginning of the experiment. At the end of each experiment, calibration was performed by recording the maximum fluorescence values after addition of 15  $\mu$ L of 10% (w/s) Triton. Results are expressed as the percentage to the maximum response obtained with triton [20].

#### **2.5. Capsaicin-induced Nociception**

The peripheral capsaicin test was carried out as previously described [21, 22]. Animals were habituated to the observation location, consisting of a glass chamber,

for at least 30 min before the experiment. After, animals received the oral or intrathecal and in different times after it was injected 20  $\mu$ L of capsaicin (1 nmol/paw) into the right hind paw and the total time spent licking and flinching the injected paw for 5 min was measured and considered a nociception index. For the spinal capsaicin test, 0.2 nmol/site of capsaicin was injected i.t. as previously described [10, 11, 22]. In this test, the total time spent licking the hind paws and tail for the 5 min following injection was determined and considered a measure of nociception. The proper vehicle of capsaicin (0.15% ethanol in saline for i.pl. test and PBS for the i.t. test) was prepared and used as a control treatment and did not evoke nociceptive behavior itself (data not shown).

## **2.6. CFA-Induced Inflammation**

To induce the development of inflammatory thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, we performed the CFA-induced inflammatory pain model. Animals were anesthetized with halothane and 20  $\mu$ L of CFA (1mg/mL suspension of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* in liquid paraffin) was injected into the right hind paw. Forty-eight hours later, the nociceptive alterations were observed [23, 22].

## **2.7. Thermal Hyperalgesia Measurement**

Thermal hyperalgesia was recorded using the method described by [24], with minor modifications. Briefly, animals were habituated in a Plexiglas chamber for 30 min and a radiant light beam generated by a 60 W light bulb was directed into to the right hind paw (Plantar test, Ugo Basile, Italy). The time elapsed between the onset of the stimulus and manifestation of the paw withdrawal response was measured automatically and was taken as an index of the thermal nociceptive threshold.

## **2.8. Mechanical Allodynia Measurement**

Mechanical allodynia was evaluated using the up-and-down method, described by [25], using von Frey filaments. Briefly, mice were placed in cages with a wire mesh bottom which allowed full access to the paws. The paw was touched with 1 of a series of 7 von Frey hairs with logarithmic increments (0.02, 0.07, 0.16, 0.4, 1.4, 4.0 and 10.0). The von Frey hairs were applied perpendicular to the plantar surface with sufficient force to cause slight buckling against the paw, and held for approximately 2–4 s. Stimuli were presented at intervals of several seconds, allowing for apparent resolution of any behavioral responses to previous stimuli.

## **2.9. Locomotor Activity**

In order to evaluate a possible non-specific muscle-relaxant or sedative effect of the compound mice were submitted to the motor impairment evaluation [26]. Firstly, we examined mice spontaneous motor coordination at the open-field test. The apparatus consisted of a Plexiglas box measuring of 40×60×50cm with the floor divided into 12 equal squares. The numbers of squares crossed with all paws and the hearing behavior were counted in a 5-min session. The forced motor activity was also evaluated at the rotarod test. Briefly, 24 h before the experiment, all animals were trained in the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm) until they could remain in the apparatus for 60s without falling. On the day of the experiment, animals were injected with eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.) 1h before and subjected to the rotarod test 1 h after the administration of the drug. The number of falls and latency to first fall from the apparatus was recorded up to 240 s.

## **2.10. Body Temperature**

Once some TRPV1 ligands induce hyperthermia, we verified if eriodictyol may induce changes in the body temperature of oral treated animals [16]. To do this, rectal temperature was determined and the animal were orally treated with vehicle, eriodictyol (4.5 mg/kg), SB366791 (10 mg/kg) or AMG9810 (10 mg/kg). In different times after administration, new measurements were taken and the difference between pre-injection and post-injection values was calculated ( $\Delta^{\circ}\text{C}$ ), as previously described [27].

## **2.11. Antioxidant Activity**

### **2.11.1 In Vitro ABTS Assay**

To determine if eriodictyol had antioxidant activity, we performed the ABTS radical reduction test [28, 29]. Briefly, 1 mL of ABTS solution (7 mM) was incubated with potassium persulphate (140 mM) during 16-18h in dark at room temperature. After, this solution was diluted (1:88) in phosphate buffer (10 mM, pH 7.0). To perform the reaction, 1 mL of diluted ABTS solution was incubated with 0.1 mL of sample for 30 min in dark. Rutin was used as positive control and water was used as blank and considered as 100% of absorbance.

### **2.11.2. Estimations of Thiol Levels in vivo**

Right after the nociception model, animals were sacrificed with halotane and the lumbar portion of the spinal cord was collected to estimate non-protein thiol content [30]. Tissue was homogenized in 1.0 mL of 0.02 M EDTA and the homogenate was centrifuged at 4,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant (300  $\mu\text{L}$ ) was incubated whit 50  $\mu\text{l}$  of 50% TCA at 4°C for 60 min and centrifuged at 12,000 g for 5 min at 4°C.



The supernatant was collected to determine the non-protein thiol content in the sample. To this, 200  $\mu$ l of Tris/HCl (200 mM, pH 8.9) and 20  $\mu$ l of DTNB (2.5 mM) were added to a 100  $\mu$ l sample in a microplate and incubated at room temperature for 5 min. The resulting color formed was measured at 405 nm with a FisherBiotech Microkinetics Reader BT 2000. Cysteine was used as a standard to determine the thiol (SH) content in the samples, and its levels were corrected for its protein contents. Protein was measured using Coomassie-Blue dye using bovine serum albumin as a standard [32].

### **2.11.3. Slot Blot Assay for 3-Nitrotyrosine in vivo**

Peroxynitrite is one of the most reactive nitrogen species formed during oxidative stress and can attack proteins and alter its function, producing 3-Nitrotyrosine (3-NT). Thus, 3-NT levels were measured after capsaicin or vehicle paw injection in lumbar spinal cord samples as a marker of reactive species production [22]. Briefly, 5  $\mu$ L of sample was added to 5  $\mu$ L of 12% SDS and 5  $\mu$ L of Laemmli buffer (0.125 M Tris, pH 6.8, 4% SDS and 20% glycerol) and incubated for 20 min at room temperature. The resulting solution was loaded in a nitrocellulose membrane under vacuum using a slot blot apparatus. The membrane was blocked in blocking buffer (3% bovine serum albumin) for 1 h and incubated with a 1:2000 dilution of anti-3-NT polyclonal antibody in PBS (0.05 mM, pH 7.4) containing 0.01% sodium azide and 0.2% Tween 20 for 1 h. The membrane was washed three times in PBS and was incubated for 1 h with an anti-rabbit IgG alkaline phosphatase secondary antibody diluted in PBS (1:8000). Blots were dried, scanned with Adobe Photoshop, and quantified with Scion Image (PC version of Macintosh compatible NIH image). The 3-NT blot had a faint background that was corrected in image analysis.

### **2.12. Drugs and Reagents**

Eriodictyol and Capsaicin was purchased from Sigma, trichloroacetic acid (TCA) and cysteine were purchased from VETEC (Rio de Janeiro, Brazil) and diluted in water prior use. Sodium dodecyl sulphate (SDS), bovine serum albumin (BSA), tween 20, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase secondary antibody, anti-3-NT polyclonal antibody,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid)), CFA, SB366791, AMG9810 and fura 2-AM (stock solution 1 mM in dimethyl sulphoxide - DMSO) were all purchased from Sigma. [ $^3$ H]-RTX was purchased from Perkin Elmer and diluted in buffer A just before use.

### **2.13. Statistical Analysis**

The results are presented as the mean $\pm$ S.E.M., except the ED<sub>50</sub> value (i.e. the dose of compound that induces antinociceptive effect to the order of 50% relative to the control value) and the EC<sub>50</sub> (i.e. the concentration of compound that inhibited the calcium influx or binding to the order of 50% relative to the control value), which is reported as geometric means accompanied by respective 95% confidence limits. The ED<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis with a sigmoid dose-response equation using GraphPad Software 5.0 (Graph Pad, USA). The percentages of inhibition are reported as mean $\pm$ S.E.M. of inhibitions obtained for each individual experiment in relation to the control values. The level of significance was set as P<0.05. Data were analysed by Student "t" test, by one or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls's (SNK).

### 3. RESULTS

#### 3.1. *Characterization of TRPV1 Antagonism*

##### 3.1.1. *[<sup>3</sup>H]-Resiniferatoxin Binding*

Initially we verified the possible interaction of eriodictyol with the TRPV1 receptor. A binding assay was performed using [<sup>3</sup>H]-RTX, which is a ligand of the vanilloid site of TRPV1 receptor. Eriodictyol was able to displace [<sup>3</sup>H]-RTX from spinal cord rat membranes with an IC<sub>50</sub> of 47 (21 - 119) nM and E<sub>max</sub> of 68.9±9.0 inhibition (Figure 2A).

##### 3.1.2. *Effects of Eriodictyol on Intrasynaptosomal Calcium Influx*

To elucidate if this binding leads to agonism or antagonism, we investigated the capacity of eriodictyol to alter the calcium influx mediated by capsaicin, a TRPV1 ligand. In this study, eriodictyol inhibited the influx elicited by capsaicin in spinal cord synaptosomes with an IC<sub>50</sub> of 44 (16 – 125) nM (Figure 2B). Eriodictyol (300 nM) in absence of capsaicin did not alter the calcium influx (results not shown).

#### 3.2. *Characterization of Eriodictyol Effects in Vivo*

##### 3.2.1. *Antinociceptive Effect of Eriodictyol*

Once we observed that eriodictyol acts as a TRPV1 antagonist, we investigated its antinociceptive effect in capsaicin-induced overt nociception test. Initially, mice were orally administered with eriodictyol, and 1 h after the test was performed. Eriodictyol developed an antinociceptive effect with an effective dose 50% (ED<sub>50</sub>) of 2 (1 - 5) mg/kg, with a maximal inhibition of 49±10 %. In the time-course study we observed that eriodictyol-induced antinociceptive effect (4.5 mg/kg, p.o.) started 1 h after treatment and lasted for up to 2 h (Figure 3A and B).

To further investigate this action, eriodictyol was also administered intrathecally (1 – 10 nmol/site) and we observed a greater and faster antinociceptive effect which started 15 min after administration, lasting until 4 h, with a  $DE_{50}$  of 2 (1 - 3) nmol/site and a maximal effect of  $64 \pm 4$  % inhibition (Figure 3C and D). Once eriodictyol acted when intrathecally administered, we performed the intrathecal capsaicin test and administered eriodictyol orally (4.5 mg/kg) to investigate if oral eriodictyol was able to reach the spinal cord and inhibit central nociceptive stimulation. In this protocol, an inhibition of  $72 \pm 6$  % in the nociception induced by capsaicin was observed (Figure 3E).

Once we did not observe any alteration over locomotor activity after eriodictyol administration both at rotarod and open field test, we can ensure that eriodictyol presented antinociceptive effect unrelated with alteration motor performance (Table 1).

### **3.2.3. CFA-Induced Nociception**

Since TRPV1 receptor may be activated during the inflammatory process at the site of inflammation and at spinal cord, we evaluated the effect of eriodictyol and the TRPV1 selective antagonists SB366791 and AMG9810, both used as positive control on the thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by CFA. One hour after administration, eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) presented anti-hyperalgesic and anti-allodynic effect, fully reversing hyperalgesia (100%) and partially reduced the allodynia ( $62 \pm 9$ %). At the same time, AMG9810 (10 mg/kg, p.o.) reduced only  $54.6 \pm 26.4$ % of the allodynia and  $94 \pm 4$ % of the hyperalgesia induced by CFA, while SB366791 (10 mg/kg, p.o.) reduced only the thermal hyperalgesia induced by CFA with  $89 \pm 10$ % of inhibition, without altering mechanical allodynia (Figure 4).

### **3.2.4. Body Temperature**

The major limitant for the use of TRPV1 antagonists at clinical trials was the development of marked hyperthermia. Thus, we assessed the possible effect of eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.), SB366791 (10 mg/kg, p.o.) and AMG9810 (10 mg/kg, p.o.) on the rectal temperature in mice. Both eriodictyol and SB366791 were not able to alter the basal temperature significantly, while AMG9810 induced an increase of  $104\pm 1\%$  of rectal temperature (Figure 5).

### **3.3. Antioxidant Activity**

It is known that TRPV1 activation not only elicits nociception, but also induces the development of oxidative stress, and it seems to contribute to central pain signaling [22]. In fact, intraplantar capsaicin test induced a decrease in the non-protein thiol levels 5 min after capsaicin injection in the lumbar spinal cord, and the oral pre-treatment with eriodictyol (4.5 mg/kg) prevented this loss (Figure 6A).

Another event chained by peripheral nocive stimulation is the increase in the formation of peroxynitrite which attacks tyrosine residues forming 3-nitrotyronise (3-NT) [31]. We also measured 3-NT levels in the lumbar spinal cord of mice treat with vehicle or eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.). As described before [22], 5 min after intraplantar capsaicin injection occurs an increased in 3-NT levels in the lumbar spinal cord, and this event was prevented by eriodictyol pre-treatment. Eriodictyol did not change the basal 3-NT levels in mice which received intraplantar vehicle (Figure 6B).

The prevention of the oxidative stress induced by intraplantar capsaicin injection may be not only due to the ability of eriodictyol to antagonize the TRPV1 receptor, but also to a possible antioxidant activity. To evaluate this possibility, we

performed the ABTS radical test used to screen antioxidant compounds. In this experiment, eriodictyol presented an antioxidant activity, similar to rutine (positive control), with an EC<sub>50</sub> of 1.7 (1.3 – 2.1) μM (Figure 6C).

#### 4. DISCUSSION

The transient receptor potential (TRP) is a super family of ionic channel formed by six transmembrane domains capable of permeating cations, mostly calcium, involved in the detection and transmission of painful stimuli mainly the subtype vanilloid 1 (TRPV1) [1]. This way, such receptor has been implicated as a promissory target to pain treatment [33]. With the aim to find new molecules that interact with this receptor, we identified the flavonoid eriodictyol. This compound inhibited the binding for TRPV1 receptor, at the same time that inhibited the calcium influx mediated by capsaicin. Eriodictyol also presented antinociceptive effect in the intraplantar and intrathecal capsaicin tests and antihyperalgesic and anti-allodynic effects in the CFA test. Furthermore, we also observed that eriodictyol fully prevented the oxidative stress induced by capsaicin at spinal cord, without changing motor activity or body temperature.

To start the search for new molecules that may interact with TRPV1 receptor, we focused on compounds found in medicinal plants that presented antinociceptive effect. With this aim, we tested several compounds in the [ $^3$ H]-RTX binding assay to determine which one could interact with the vanilloid site of TRPV1. In this first trial (unpublished results), we selected the flavonoid eriodictyol, which displaces the [ $^3$ H]-RTX binding with greater potency (proximally 47 nM) than the classical TRPV1 agonist capsaicin (proximally 3200 nM) [34]. Then, the next step was to elucidate if this interaction leads to functional modification of the receptor through a capsaicin-mediated calcium influx assay. In this experiment, eriodictyol inhibited this influx with a similar potency to displace the binding assay. This indicates that eriodictyol acts as an antagonist over the TRPV1 receptor and presents greater potency to inhibit the

calcium influx than some classical TRPV1 antagonists, such as SB366791 (651.9 nM [35]), 5-iodoresineferatoxin (56.7 nM; [36]) and capsazepine (7.7  $\mu$ M; [37]).

Currently, the TRPV1 receptor is considered the most promising target for the development of new analgesic drugs [37]. The vanilloid receptor is largely distributed both at the periphery of the organism, where it acts as a sensor of noxious stimuli, and in the spinal cord, where it participates in the transmission of pain [39]. Once it was observed that eriodictyol acts as an antagonist of TRPV1 receptor *in vitro* and that this may be an important finding for the treatment of pain, our next step was to investigate if eriodictyol could attenuate the nociception induced by capsaicin. In this matter, eriodictyol presented antinociception with good efficacy and potency when administered both by oral and intrathecal routes. Additionally, oral eriodictyol administration was able to attenuate intrathecal capsaicin-induced nociception, which may indicate that eriodictyol may reach the spinal cord and exert its antinociceptive action. This is a very important feature for new drug development, whereas the oral route is the main administration via used to treat painful condition in humans [40].

Despite the fact that capsaicin pain model is useful to screen possible antinociceptive compounds that act over the TRPV1 receptor, it does not present a good correlation with clinical painful conditions [41]. This way, we tested eriodictyol, SB366791 and AMG9810 effect over the CFA-induced arthritis. As a result, eriodictyol and AMG9810 presented both anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects, while SB366791 presented only anti-hyperalgesic effect. In addition, TRPV1 also may be modulated in several painful processes to increase the pain sensibility. As observed in the chronic inflammation induced by CFA, in rodents occurs an increase in the expression of TRPV1 protein at the site of inflammation increasing the sensibility to thermal stimulation [42]. The increase in TRPV1 expression was also



reported in humans presenting local inflammation [43]. In chronic painful processes, an increase in the TRPV1 function mediated by post-transcriptional events, such as phosphorylation and nitration in distinct sites of the TRPV1 receptor, was observed [44, 45]. All these facts clearly indicate the critical role of this receptor and its importance in painful processes. In spite of that, eriodictyol was effective to reverse the nociception established by CFA, a fact that is very important from the clinic aspect once patients are treated for well established painful conditions.

We also observed that eriodictyol presented no effect on the body temperature, a common side effect of TRPV1 antagonists, while AMG9810 induced hyperthermia in mice. Recently, it was described that AMG517, an analog of AMG9810, presented markedly and persistent hyperalgesia (proximally 40°C) in human in doses smaller than the necessary to elicit analgesic effect. Thus, the hyperthermia elicited by AMG517 showed to be resistant to classical treatments to reduce fever, such as acetaminophen. This hyperthermia was attributed to an increase in the peripheral vasoconstriction, which ends up decreasing the heat loss through the skin, increasing the body temperature [9]. As eriodictyol possesses vasorelaxig property [46], this could explain why eriodictyol did not induce hyperthermia. These data suggest a better safety of eriodictyol treatment over other TRPV1 antagonists.

Recently, it was described by our research group that capsaicin-induced nociception may be attenuated by antioxidants, such as as N-acetylcysteine (NAC) leading to the development of oxidative stress at spinal cord. Thus, it seems to be an important mechanism of induction/transmission of pain in mice [22]. TRPV1 receptor seems to have a critical role in the oxidative stress-mediated nociception since the stimulation of TRPV1 may induce oxidative stress in sensory neurons and in spinal cord as well as some oxidants may modulate TRPV1 receptor function [44, 47, 22].

Here, we also described that eriodictyol also prevented the development of oxidative stress at lumbar spinal cord. This effect may be due to its direct antagonism over the TRPV1 receptor or by a direct antioxidant effect. To clarify this, we performed the ABTS test and confirmed that eriodictyol also presents direct antioxidant effect [47]. Despite eriodictyol presents a greater potency to antagonize the TRPV1 receptor than its antioxidant activity (proximally 38 fold), a direct antioxidant effect could contribute, at least in part, to its antinociceptive effect.

In several animal pain models it was already described the development of oxidative stress and it was pointed as a mechanism of induction/maintenance of pain (Kim *et al.*, 2008). This fact is strengthened by the fact that some antioxidant substances present antinociceptive effect on both mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, as observed for eriodictyol [49, 22]. Some molecular targets involved in nociception had already been described for oxidative stress, as the NMDA receptor and the excitatory amino acid transporter 1 (EAAT<sub>1</sub>) [31]. Thus, eriodictyol could induce antinociception by directly antagonizing the TRPV1 receptor and by protecting other targets of reactive species.

In conclusion, the flavonoid eriodictyol induces antinociceptive, anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects without altering the locomotor activity or body temperature in mice. These effects seem to be due to its combined antagonist effect over the TRPV1 and to its antioxidant effect. Thus, eriodictyol may be considered a good prototype for the development of more efficacious and/or potent agents for the pain treatment.

***Acknowledgments***

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Molecular (MCT/CNPq), by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), by Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil). We also thanks for the help of Dr Geraldo Coelho, from Department of Biology and Chemistry (UNIJUÍ) for the identification of plant material. The fellowships from CNPq, CAPES and FAPERGS are also acknowledged.

## 5. REFERENCE

- [1] Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):165-217.
- [2] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816 - 824.
- [3] Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005 Feb 22;2005(272).
- [4] Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, et al. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethylbenzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:410–21.
- [5] Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:387–93.
- [6] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306–13.
- [7] Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in

- acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*. 2005 Oct;117(3):368-76.
- [8] Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain*. 2010 Mar 5;6:15.
- [9] Gavva, N.R., Treanor, J.J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., Jang, G.R., Kessler, J.P., Ni, L., Norman, M.H., Palluconi, G., Rose, M.J., Salfi, M., Tan, E., Romanovsky, A.A., Banfield, C., Davar, G.,. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008; 136, 202–210.
- [10] Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Perkins MN, Reid DJ, Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *J Med Chem*. 1993 Aug 6;36(16):2362-72.
- [11] Walpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN, Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *J Med Chem*. 1993 Aug 6;36(16):2373-80.
- [12] Koleckar V, Opletal L, Brojerova E, Rehakova Z, Cervenka F, Kubikova K, Kuca K, Jun D, Polasek M, Kunes J, Jahodar L. Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008 23(2):218-24.

- [13] Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, Zuidhof AJ. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*. 2003 Apr;102(3):297-307.
- [14] Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens RL Jr. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res*. 2006 Oct 16;173(2):211-6.
- [15] Zimmermann M, 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110, 1983.
- [16] Gawva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC, Treanor JJS. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-Butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)acrylamide], a Novel Vanilloid Receptor 1 (TRPV1) Antagonist with Antihyperalgesic Properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;313(1):474-84.
- [17] Kopczyńska B. Role of VR1 and CB1 receptors in modelling of cardio-respiratory response to arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid, in rats. *Life Sci*. 2008 Jul 18;83(3-4):85-91.
- [18] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67: 313-6, 1980.
- [19] Szallasi A, Biro T, Modarres S, Garlaschelli L, Petersen M, Klusch A, Vidari G, Jonassohn M, De Rosa S, Sterner O. Dialdehyde sesquiterpenes and other terpenoids as vanilloids. *Eur J Pharmacol* 1998; 356:81–89.

- [20] Bergsman JB, Tsien RW. Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1. *J Neurosci*. 2000 Jun 15;20(12):4368-78.
- [21] Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, 31: 1279-85, 1992.
- [22] Rossato MF, Velloso NA, de Oliveira Ferreira AP, de Mello CF, Ferreira J. Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. *J Pain*. 2010 Jun;11(6):545-54.
- [23] Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 2001 Dec;41(8):1006-12.
- [24] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988 Jan;32(1):77-88.
- [25] Dixon W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462.
- [26] Walker CIB, Trevisan G, Rossato MF, Franciscato C, Pereira M E, Ferreira J, Manfron MP. Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2008 120:169–175.
- [27] Otuki MF, Lima FV, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Delle Monache F, Yunes RA, Calixto JB. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sci*. 2001 Sep 28;69(19):2225-36.

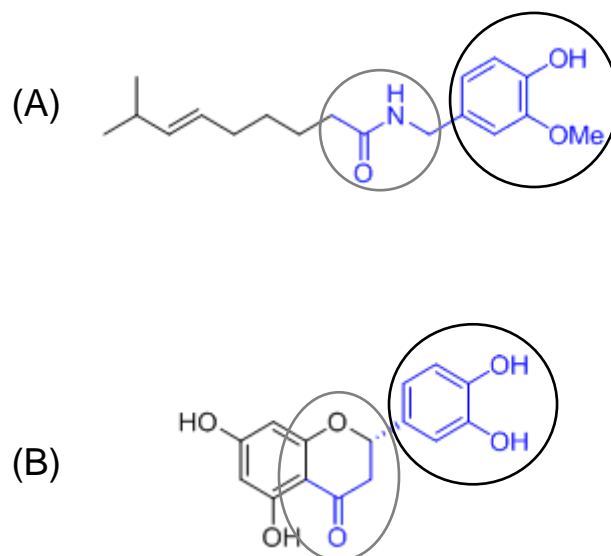
- [28] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 26: 1231–1237, 1999.
- [29] Klafke JZ, da Silva MA, Panigas TF, Belli KC, de Oliveira MF, Barichello MM, Rigo FK, Rossato MF, Soares dos Santos AR, Pizzolatti MG, Ferreira J, Vicili PR. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *J Ethnopharmacol.* 2010 Feb 3;127(2):299-305.
- [30] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound and sulphidril groups in tissue with Elman's reagent. *Anal Biochem* 25:192-205, 1968.
- [31] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
- [32] Chen Z, Muscoli C, Doyle T, Bryant L, Cuzzocrea S, Mollace V, Mastroianni R, Masini E, Salvemini D. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain.* 2010 Apr;149(1):100-6.
- [33] Pal M, Angaru S, Kodimuthali A, Dhingra N. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. *Curr Pharm Des.* 2009;15(9):1008-26.
- [34] Szallasi A, Szabó T, Bíró T, Modarres S, Blumberg PM, Krause JE, Cortright DN, Appendino G. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(2):428-34.



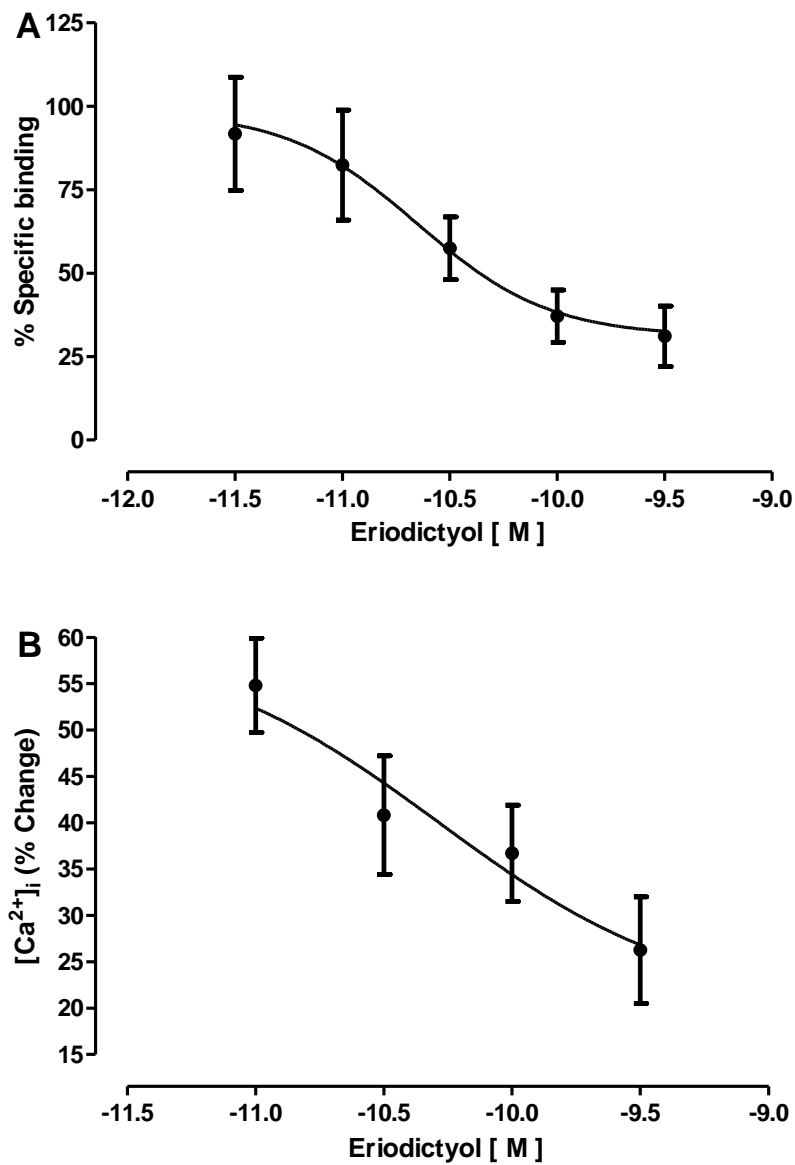
- [35] Varga A, Németh J, Szabó A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neuroscience Letters* 385 (2005) 137–142
- [36] Shimizu I, Iida T, Horiuchi N, Caterina MJ. 5-Iodoresiniferatoxin evokes hypothermia in mice and is a partial transient receptor potential vanilloid 1 agonist in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Sep; 314(3):1378-85.
- [37] Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol.* 1997 Aug;121(7):1461-7.
- [38] Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev.* 2009 Apr; 60(1):267-77.
- [39] Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jan;8(1):55-68.
- [40] Buxton ILO, 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: the dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. In: Brunton, L., Lazo, J.S., Parker, K.L.P. (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. The McGraw-Hill, pp. 1–40.
- [41] Haanpää ML, Backonja MM, Bennett MI, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson PT, Jensen TS, Kauppila T, Rice AS, Smith BH, Treede RD, Baron R. Assessment of neuropathic pain in primary care. *Am J Med.* 2009 Oct;122(10 Suppl):S13-21.
- [42] Yu L, Yang F, Luo H, Liu FY, Han JS, Xing GG, Wan Y. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory

- nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain*. 2008 Dec 4;4:61
- [43] Shieh KR, Yi CH, Liu TT, Tseng HL, Ho HC, Hsieh HT, Chen CL. Evidence for neurotrophic factors associating with TRPV1 gene expression in the inflamed human esophagus. *Neurogastroenterol Motil*. 2010 Jun 1.
- [44] Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* 2006; 2: 596 - 607.
- [45] Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 24;106(47):2009; 7-102.
- [46] Ma F, Zhang L, Westlund KN. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol Pain*. 2009 Jun 17;5:31.
- [47] Ramón Sánchez de Rojas V, Somoza B, Ortega T, Villar AM, Tejerina T. Vasodilatory effect in rat aorta of eriodictyol obtained from *Satureja obovata*. *Planta Med*. 1999 Apr;65(3):234-8.
- [48] Narváez-Mastache JM, Novillo F, Delgado G. Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry*. 2008 Jan;69(2):451-6.
- [49] Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliabatella G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111: 116-24, 2004.

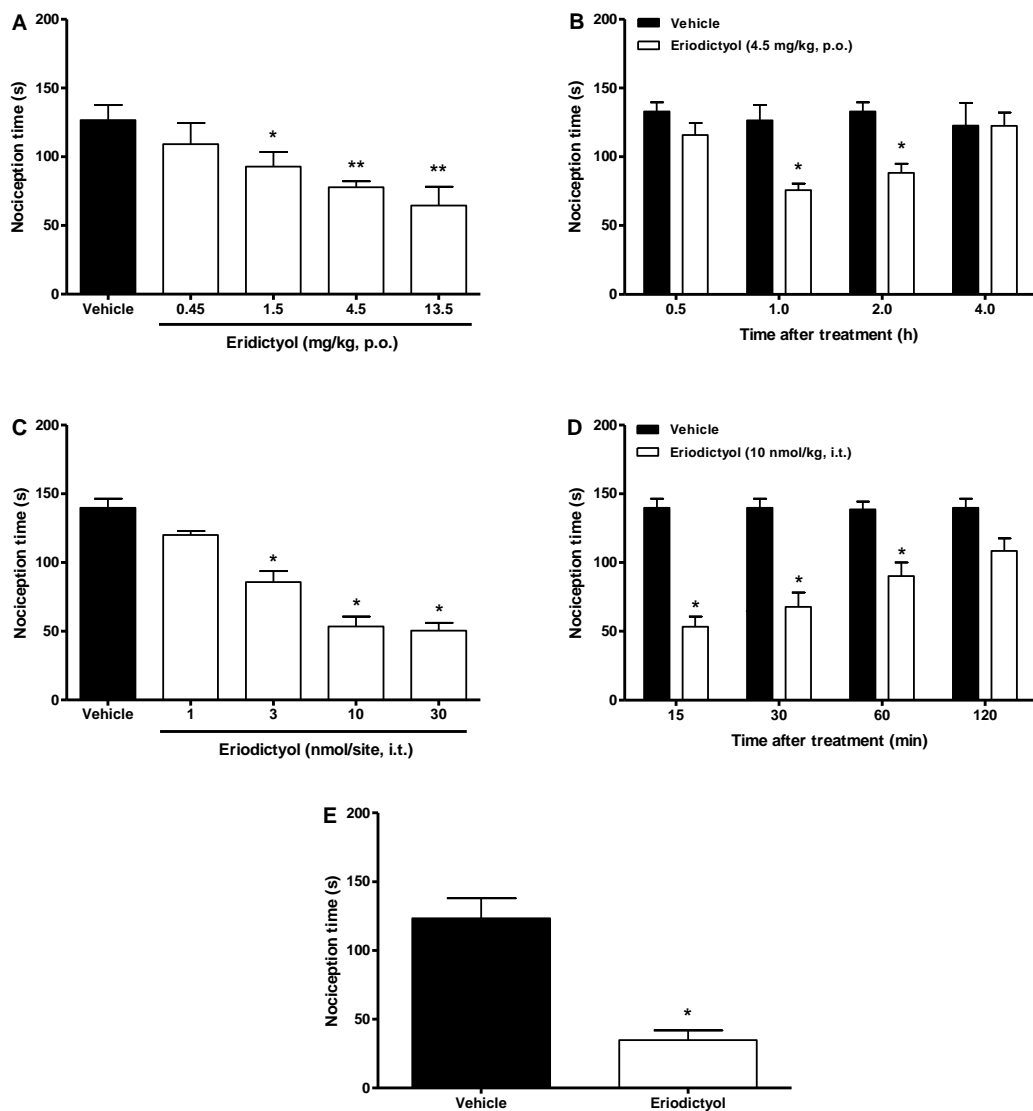
## FIGURE AND LEGENDS



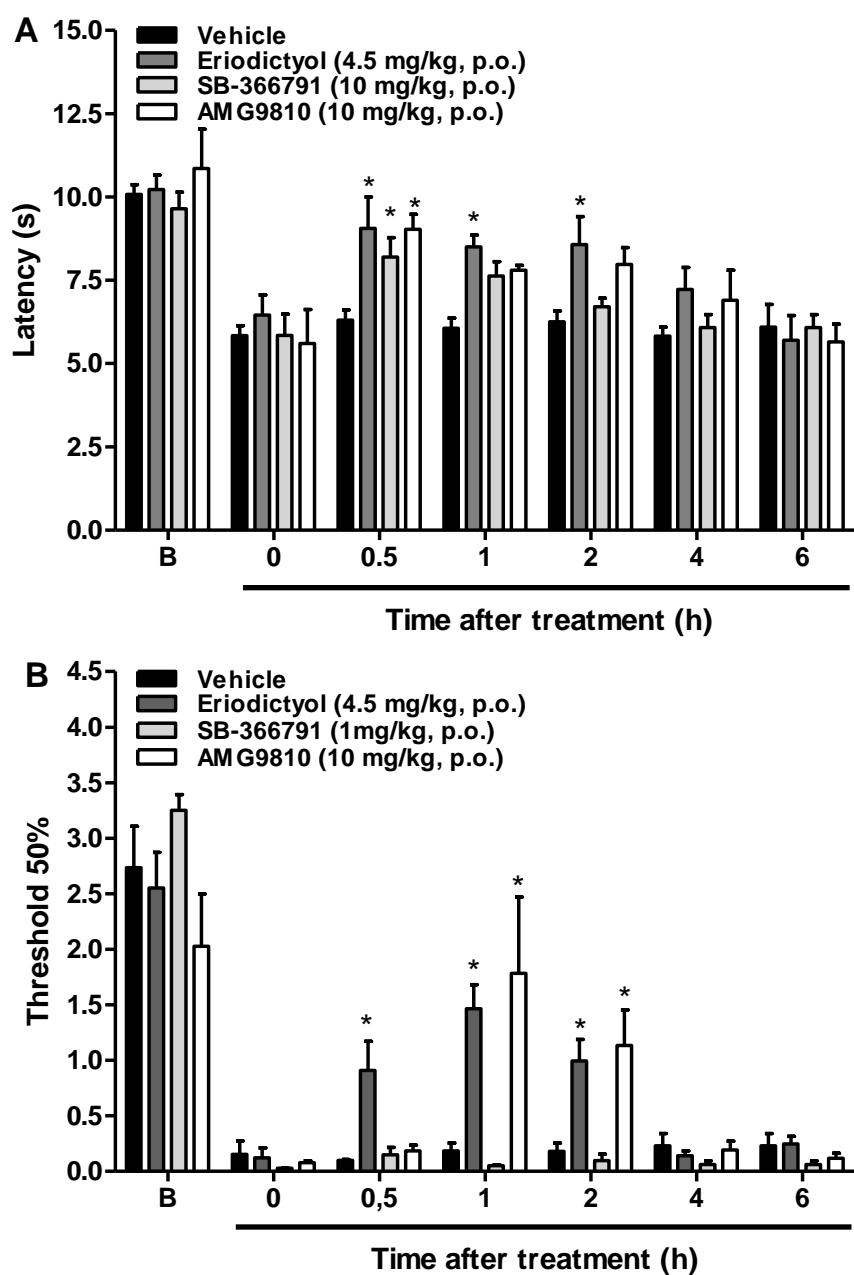
**Figure 1:** Chemical structures of the TRPV1 receptor ligands (A) capsaicin and (B) the flavonoid eriodictyol (3', 4', 5, 7- tetrahydroxyflavanone). Blue marks represent the bioisosteric regions between capsaicin and eriodictyol, the black circle represents the region A and the grey circle represents the region B.



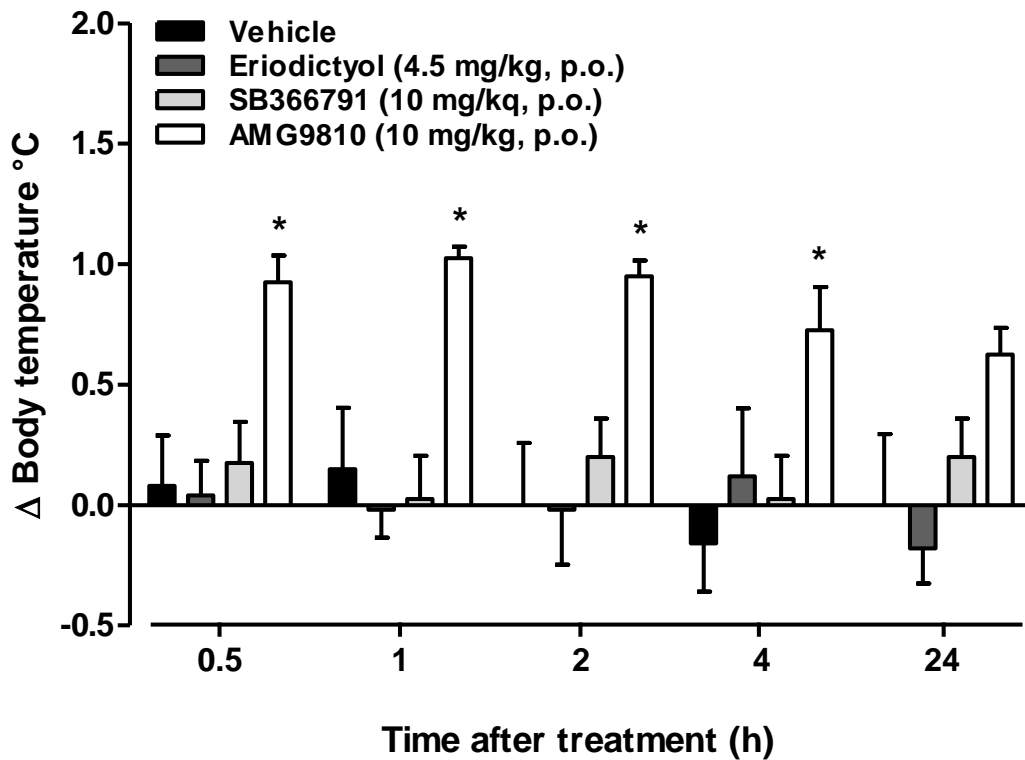
**Figure 2:** Effects of eriodictyol on the TRPV1 receptor. Capacity of eriodictyol to bind in the TRPV1 receptor and displace [<sup>3</sup>H]-RTX binding (A), and inhibit the calcium influx elicited by capsaicin (20  $\mu$ M) (B). Data are expressed as mean+SEM (n=3); IC<sub>50</sub> values were calculated by non-linear regression.



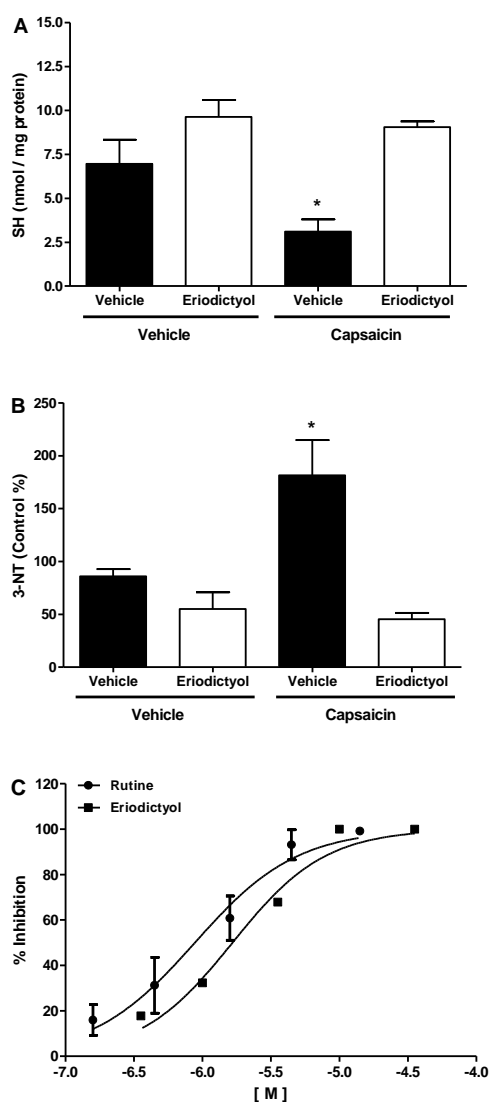
**Figure 3:** Antinociceptive effect of eriodictyol on the capsaicin test. Dose response effect of eriodictyol administered orally (A) or intrathecally (C) in the intraplantar capsaicin test. Time-course of eriodictyol administered orally (B; 4.5 mg/kg) or intrathecally (D; 10 nmol/site) in the intraplantar capsaicin test. (E). Effect of eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) on the nociception induced by intratecal capsaicin (0.2 nmol/site). Data are expressed as mean±S.E.M. (n=5-6). \* $p < 0.05$ , based on Student “*t*” test (E), one-way (A and C) followed by or two-way (B and D) ANOVA followed by SNK post-hoc test.



**Figure 4:** Effect of eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.), SB366791 (10 mg/kg, p.o.) and AMG9810 (10 mg/kg, p.o.) on the nociception induced by complete Freund's adjuvant (CFA). Effects of the different treatments on (A) hyperalgesia and (B) allodynia elicited by intraplantar CFA. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n=5-6). \* $p$ <0.05, based on two-way ANOVA followed by SNK post-hoc test.



**Figure 5:** Body temperature measured after treatment with eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.), SB-366971 (10 mg/kg, p.o.) or AMG9810 (10 mg/kg, p.o.). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. \* $p$ <0.05, two-way ANOVA followed by SNK post-hoc test, compared with vehicle pre-treated mice (n=5).



**Figure 6:** Markers of oxidative stress levels measured in lumbar spinal cord sample 5 min after intraplantar capsaicin injection (1 nmol/paw). Non-protein thiol content (SH; A) or nitrotyrosine (3-NT; B) after eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) treatment (n=4-6). Antioxidant effect of eriodictyol or rutine in the ABTS scavenger assay (C). Data are expressed as mean±S.E.M (n=5-6). \* $p < 0.05$ , compared with vehicle pre-treated mice (black bars) based on one-way ANOVA and SNK post-hoc. Non-protein thiol levels are represented as free SH levels and 3-NT is represented as % of control (vehicle-vehicle) treated group, respectively.



**Table 1:** Side effects evaluated 1 h after vehicle or eriodictyol (4.5 mg/kg, p.o.) administration.

<i>Treatment</i> (p.o.)	<i>Rotarod</i>		<i>Open Field</i>	
	<i>First Fall (s)</i>	<i>Falls</i>	<i>Crossing</i>	<i>Rearing</i>
<b>Vehicle</b>	93.2±12.0	2.3±0.8	50.8±7.2	13.6±1.9
<b>Eriodictyol</b>	64.6±32.2	1.3±0.9	33.5±6.6	8.5±2.6

No significant differences were observed between groups, two-way ANOVA. Results are expressed as the mean±S.E.M (n=5).

---

**6. DISCUSSÃO**

Os receptores de potencial transitório (TRP) são uma super família de canais iônicos formados por seis domínios transmembrana capazes de promover o influxo de cátions, principalmente cálcio, envolvidos na detecção e transmissão de estímulos nocivos, principalmente o subtipo vanilóide 1 (TRPV1) (Nilius *et al.*, 2007). Por esse motivo, este receptor tem sido apontado como um alvo promissor para o tratamento da dor (Pal *et al.*, 2009). Com o objetivo de descobrir moléculas que interajam com esse receptor, nós identificamos o flavonóide eriodictiol. Este composto deslocou o radioligante [<sup>3</sup>H]-RTX em ensaio de união específica para o receptor TRPV1 ao mesmo tempo em que inibiu o influxo de cálcio estimulado por capsaicina. Eriodictiol também apresentou efeito antinociceptivo no teste da capsaicina intraplantar e intratecal, além de apresentar efeito também sobre a alodínia e hyperalgesia induzidos por CFA. Adicionalmente, também observamos que o eriodictiol preveniu completamente o estresse oxidativo induzido por capsaicina intraplantar em amostras da porção lombar da medula espinhal de camundongos, sem alterar a temperatura corporal dos animais.

Para iniciar a busca por novas moléculas que possam interagir com o receptor TRPV1, nós focamos nossa atenção em compostos presentes em plantas utilizadas popularmente para tratar dores e inflamações. Neste primeiro momento, buscamos por substâncias de diferentes classes químicas presentes em plantas como a *Vernonia tweedieana* (assa-peixe), utilizada popularmente para o tratamento de inflamações cujas atividades foram confirmadas em trabalhos de nosso grupo de pesquisa. A partir do fracionamento do extrato bruto de diferentes partes desta planta, pudemos evidenciar sua atividade antinociceptiva em diferentes testes comportamentais com animais. Utilizando as frações com atividade antinociceptiva no teste da capsaicina intraplantar, realizamos o isolamento de diferentes compostos, como  $\alpha,\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, lupeol, espinasterol, entre outros. Além disso, analisamos possíveis indícios químicos nessas estruturas que possibilitassem a interação dessas moléculas com o receptor TRPV1 e os testamos em ensaios de união específica para o receptor TRPV1 para determinar quais poderiam interagir com o sítio vanilóide deste receptor. Neste processo de triagem selecionamos o flavonóide eriodictiol. Analisando sua estrutura química, observamos que o composto eriodictiol apresenta similaridades estruturais bioisostéricas com o ligante TRPV1 capsaicina (Introdução, figura 1). Um destes pontos de relação bioisostéricas pode ser observado no fechamento do anel acil-*N*-vanilil presente na

molécula da capsaicina (círculo preto, região A). Esta modificação forma um anel 5,7-dihidroxicroman-4-ano na molécula do eriodictiol. Esta região é responsável por apresentar as características elétricas necessárias à interação da molécula com o sítio vanilóide do receptor TRPV1. Além disso, é possível observar a troca de um radical metoxil (-OMe) da molécula da capsaicina por um radical hidroxil (-OH) na molécula do eriodictiol. Essa característica estrutural pode ser observada em outros compostos antagonistas do receptor TRPV1, como a capsazepina (Docherti, 1997). Outra modificação não-clássica é observada na troca da ligação amida (-COM-) presente na capsaicina por um grupamento cetona (-COC-) na molécula do eriodictiol (círculo cinza, região B). Esta região é responsável por conferir um dobramento espacial da molécula favorável à interação com o receptor TRPV1. Esta estratégia tem sido utilizada na química medicinal para o desenvolvimento de novos compostos com o principal objetivo de manter características eletrônicas necessárias para a interação com diferentes alvos farmacológicos, visando alterar pontos de possíveis interações inespecíficas ou indesejáveis para a obtenção de compostos mais eficazes e/ou seguros (Patani e LaVoie, 1996; Lima e Barreiro, 2005).

Para investigar se estas características químicas refletiriam em uma possível interação com o receptor TRPV1, avaliamos primeiramente sua atividade em um ensaio de união específica, no qual observamos que este foi capaz de inibir o ensaio com potência de aproximadamente 47 nM, maior que o ligante clássico do receptor, como a capsaicina (aproximadamente 3200 nM) (Szallassi *et al.*, 1999). Uma vez que observamos este fato, nosso próximo passo foi averiguar se esta ligação ao receptor promoveria alguma alteração funcional sobre o TRPV1. Para isso realizamos um ensaio de influxo de cálcio estimulado por capsaicina. Neste experimento, observamos que o eriodictiol foi capaz de promover uma diminuição no influxo estimulado por capsaicina, com potencia similar ao que interage com o receptor. Este resultado indicou que o eriodictiol é capaz de se ligar ao receptor TRPV1 e atuar como um antagonista sobre o mesmo. Neste experimento também foi possível observar que a capacidade do eriodictiol de inibir o influxo de cálcio é maior que o de alguns antagonistas clássicos do TRPV1, como SB366791 (651,9 nM; Varga *et al.*, 2005), 5-iodoresineferatoxina (56,7 nM; Shimizu *et al.*, 2005) e capsazepina (7,7 µM; Docherti, 1997).

Atualmente, o receptor TRPV1 é considerado como um dos alvos farmacológicos mais promissores para o tratamento da dor (Wong *et al.*, 2009). O

receptor vanilóide é amplamente distribuído no organismo, onde age como um sensor para diferentes tipos de estímulos nocivos, bem como na medula espinhal, onde participa da transmissão do estímulo doloroso (Patapoutian *et al.*, 2009). Como observamos que o eriodictiol atua como um antagonista do receptor TRPV1 *in vitro*, decidimos investigar se o eriodictiol seria capaz de atenuar a nocicepção induzida por capsaicina. Observamos que o eriodictiol apresenta efeito antinociceptivo com boa eficácia e potencia quando administrado tanto por via oral quanto por via intratecal. Adicionalmente, a administração oral de eriodictiol também foi capaz de atenuar a nocicepção induzida por capsaicina intratecal, o que pode indicar que o composto consegue transpor a barreira hemato-encefálica e atuar diretamente no sistema nervoso central. Estas são características muito importantes para o desenvolvimento de um novo fármaco utilizado para o combate da dor, pois a via oral é a principal via de administração para fármacos utilizados no combate da dor em humanos (Buxton, 2006).

Apesar de o teste da nocicepção induzida por capsaicina ser um bom modelo animal para ensaios pré-clínicos, não apresenta boa correlação com diversas condições clínicas (Haanpää *et al.*, 2009). Devido a isso, investigamos posteriormente a ação do eriodictiol sobre a nocicepção crônica induzida por CFA intraplantar, um modelo experimental de artrite. Como resultado, constatamos que o eriodictiol e o AMG8910 (antagonista TRPV1 usado como controle positivo) apresentaram tanto efeito anti-hiperalgésico quanto anti-alodínico, enquanto o SB366791 (outro antagonista TRPV1 usado como controle positivo) apresentou apenas efeito anti-alodínico. Adicionalmente, o TRPV1 pode ser modulado em diferentes processos dolorosos para ampliar a sensibilidade a dolorosa. Como observado durante os eventos crônicos (como a inflamação induzida por CFA), ocorre um aumento da expressão do receptor TRPV1 tanto no local da inflamação quanto na medula espinhal, aumentando a sensibilidade a estímulos nocivos, principalmente de ordem térmica (Yu *et al.*, 2008). Em humanos apresentando processo inflamatório é evidenciado um aumento na expressão do receptor TRPV1, bem como da sensibilidade a estímulos térmicos (Shieeh *et al.*, 2010). Além disso, em diferentes tipos de processos dolorosos crônicos é observado um aumento da funcionalidade deste receptor devido a alterações pós-transcricionais (Yoshida *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2009). Todos esses fatos claramente indicam a importância deste receptor em eventos dolorosos. Neste mesmo contexto, observamos que o

eriodictiol foi capaz de desencadear um bom efeito antinociceptivo em um processo doloroso estabelecido, condição essa que mimetiza a prática clínica do combate a dor.

Também verificamos que o eriodictiol não apresentou nenhum efeito sobre a temperatura corporal dos animais, enquanto que o AMG9810 induziu um aumento significativo e duradouro na temperatura corporal dos animais. Recentemente foi descrito em uma triagem com humanos que o antagonista AMG517, um análogo do AMG9810 desenvolveu hipertermia duradoura (aproximadamente 40°C) e pouco responsiva a fármacos como paracetamol e dipirona. Ainda, este efeito foi observado em doses menores que as necessárias para desencadear efeito antinociceptivo. Este efeito hipertérmico foi atribuído ao fato de o receptor TRPV1 controlar o tônus de contração/relaxamento dos capilares periféricos. A inibição deste receptor neste sítio promoveria uma vaso-constricção, diminuindo a perda de calor pela periferia do organismo e aumentando a temperatura corporal (Gavva *et al.*, 2008). Como o eriodictiol apresenta atividade vaso-relaxante (Ramóm Sánches de Rojas *et al.*, 1998), este efeito poderia contrabalançar a vaso-constricção induzida pela antagonização do receptor TRPV1, sugerindo um melhor perfil em termos de segurança que os demais antagonistas TRPV1 para utilização clínica.

Recentemente, nosso grupo descreveu que a nocicepção induzida por capsaicina intraplantar pode ser atenuada por substâncias antioxidantes como a NAC, e essa estimulação leva ao desenvolvimento de estresse oxidativo na medula espinhal. Assim, parece que as ERs participam do processo de sinalização espinhal de indução/transmissão da dor em camundongos (Rossato *et al.*, 2010). Diversos trabalhos têm sugerido o importante papel do receptor TRPV1 na nocicepção induzida por estresse oxidativo uma vez que a sua estimulação pode levar diretamente a um aumento do estresse oxidativo em células neuronais e na medula espinhal, bem como alguns agentes oxidantes são capazes de ativar este receptor (Yoshida *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009; Rossato *et al.*, 2010). Neste trabalho demonstramos que o eriodictiol, além de induzir antinocicepção, preveniu o desenvolvimento de estresse oxidativo na medula espinhal de camundongos. Este efeito pode se dever ao fato de o eriodictiol impedir a ativação do receptor TRPV1, um importante estimulador da produção de ERs, ou pelo fato de o eriodictiol apresentar uma boa capacidade antioxidante. Para confirmar essa hipótese, realizamos o teste de neutralização do radical ABTS, utilizada para triar substâncias

com capacidade antioxidante, e confirmamos sua atividade antioxidante (Narváez-Mastache *et al.*, 2008). Apesar disso, eriodictiol apresentou uma afinidade pelo receptor TRPV1 muito maior que a sua capacidade antioxidante (38 vezes, aproximadamente). Assim, é possível que sua atividade antioxidante não seja crítica para o efeito global do eriodictiol, mas contribua para a sua antinocicepção.

Em diferentes modelos dor utilizando animais de laboratório já foi descrito o desenvolvimento de estresse oxidativo e isso foi apontado como um importante mecanismo de indução/manutenção da dor (Kim *et al.*, 2008). Este evento é reforçado pelo fato de compostos antioxidante como a NAC apresentarem tanto efeito anti-hiperalgésico quanto anti-alodínico em modelos animais de dor, como observado para o eriodictiol (Kim *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2010). Alguns alvos moleculares já foram descritos para a atividade das ERs, como o receptor NMDA e o EAAT<sub>1</sub> (Chen *et al.*, 2010). Assim, seria possível que o eriodictiol apresentasse atividade antinociceptiva por agir em outros alvos que não o receptor TRPV1.

Concluindo, o flavonóide eriodictiol apresenta efeito antinociceptivo, anti-hiperalgésico e anti-alodínico, sem alterações na coordenação motora ou temperatura corporal de camundongos. Esses efeitos se devem ao efeito combinado da atividade antagonista sobre o receptor TRPV1 e sua capacidade antioxidante. Assim, o eriodictiol pode ser considerado um bom protótipo para o desenvolvimento de moléculas mais eficazes e/ou potentes para o tratamento da dor.

---

## 7. CONCLUSÕES



---

A partir dos dados obtidos neste trabalho, concluímos que o flavonóide eriodictiol é capaz de se ligar ao receptor TRPV1 no sítio vanilóide, e atuar sobre este como um antagonista. Devido a este efeito, o eriodictiol desencadeia efeito antinociceptivo no teste da capsaicina e efeito anti-alodínico e anti-hiperalgésico no teste da inflamação crônica induzida por CFA, sem induzir hipertermia ou alteração na atividade locomotora. Concomitantemente, o eriodictiol apresenta efeito antioxidante *in vivo*, prevenindo o estresse oxidativo na medula espinhal induzido pela capsaicina, bem como no teste de neutralização do radical ABTS *in vitro*.

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- Beckman IS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1620 - 24.
- Bölcskei K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 2005; 117: 368-76.
- Buxton ILO. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: the dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. In: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10<sup>o</sup> ed. Nashville, Tennessee: The McGraw-Hill; 2006.
- Cabrera A L e Klein RM. Fascículo Compostas. Tribo Verninae in REITZ, R. *Flora Illustrada Catarinense. As Plantas, Parte I. Itaja* , p.324-326, 1980.
- Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 179-208.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288: 306–13.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816 - 24.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816 - 824.
- Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield DA. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 81–85.
- Chen Z, Muscoli C, Doyle T, Bryant L, Cuzzocrea S, Mollace V, Mastroianni R, Masini E, Salvemini D. NMDA-receptor activation and nitroxidative regulation of the glutamatergic pathway during nociceptive processing. *Pain* 2010; 149: 100-6.

- 
- Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE. Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry* 2004; 43: 2501-11.
- Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 7-102.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-24.
- Clavin M, Gorzalczany S, Machoc A, Muñoz A, Ferraro G, Acevedo C, Martino V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J Ethnopharmacology* 112 (2007) 585–589
- Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969; 224:285-7.
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 1997; 121:1461-7.
- Driedger PE, Blumberg PM. Different biological targets for resiniferatoxin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Cancer Res* 1980; 40: 1400-4.
- Ferrer-Montiel A, García-Martínez C, Morenilla-Palao C, García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Planells-Cases R. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1820-6.
- Gaudet R. TRP channels entering the structural era. *J Physiol* 2008; 586: 3565-75
- Gaudet, R., 2009. Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol* 133, 231–237.
- Gavva, N.R., Treanor, J.J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., Jang, G.R., Kesslak, J.P., Ni, L., Norman, M.H., Palluconi, G., Rose, M.J., Salfi, M., Tan, E., Romanovsky, A.A., Banfield, C., Davar, G.,. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008; 136, 202–10.
- Guedes RP, Bosco LD, Teixeira CM, Araújo AS, Llesuy S, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochemical Research* 2006; 31: 603 - 609.
- Haanpää ML, Backonja MM, Bennett MI, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson PT, Jensen TS, Kauppila T, Rice AS, Smith BH, Treede RD, Baron R.

- Assessment of neuropathic pain in primary care. *Am J Med* 2009; 122: 13-21.
- Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens RL Jr. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Res* 2006; 173: 211-6.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-47.
- Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 2000; 23: 159-66.
- Hergenbahn, M., Adolf, W., & Hecker, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. *Tetrahedron Lett* 1975; 19:1595–98.
- Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethylbenzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 410–21.
- Hsu CC, Bien MY, Huang YT, Ruan T, Kou YR, Lin YS. N-arachidonyl dopamine sensitizes rat capsaicin-sensitive lung vagal afferents via activation of TRPV1 receptors. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 167: 323-32.
- Huang HS, Pan HL, Stahl GL, Longhurst JC. Ischemia- and reperfusion-sensitive cardiac sympathetic afferents: influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radicals. *American Journal of Physiology* 1995; 269: 888-901.
- Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 83-91.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6155-60
- Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 582-91.
- James IF, Walpole CS, Hixon J, Wood JN, Wrigglesworth R. Long-lasting agonist activity produced by a capsaicin-like photoaffinity probe. *Mol Pharmacol* 1988; 33: 643-9.

- 
- Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gabor, A. Pharmacologically induced selective regeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977; 270: 741– 743.
- Jara-Oseguera A, Simon SA, Rosenbaum T. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 255-69.
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res* 2002; 36:1331-6.
- Johnson J, Maher P, Hanneken A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase II gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2398–2406.
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 2002; 277: 448-54
- Kim HK, Park SK, Zhou JL, Tagliatela G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 111: 116-24.
- Kim HY, Chung JM, Chung K. Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: the effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett* 2008; 447:87-91.
- Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain* 2008; 24: 142-54.
- Koleckar V, Opletal L, Brojerova E, Rehakova Z, Cervenka F, Kubikova K, Kuca K, Jun D, Polasek M, Kunes J, Jahodar L. Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008; 23:218-24.
- Kress M, Riedl B, Reeh PW. Effects of oxygen radicals on nociceptive afferents in the rat skin in vitro. *Pain* 1995; 62: 87-94.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009; 17;7:97.
- Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys* 2009; 42: 201-46.

- 
- Lima LM, Barreiro EJ. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr Med Chem* 2005; 12: 23-49.
- Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 2008; 137: 473-7.
- Lundberg JM, Martling CR, Saria A. Substance P and capsaicin-induced contraction of human bronchi. *Acta Physiol Scand* 1983;119:49–53.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3655–3660.
- Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7: 195-202.
- Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T. Identification and Antioxidant Activity of Flavonoid Metabolites in Plasma and Urine of Eriocitrin-Treated Rats. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3217-24.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 2002; 108: 595-8.
- Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989; 2: 1313-23.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005; 22.
- Moran LK, Gutteridge JMC, Quinlan GJ. Thiols in Cellular Redox Signalling and Control. *Current Medicinal Chemistry* 2001; 8: 763-772.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 2009; 417:1-13.
- Narváez-Mastache JM, Novillo F, Delgado G. Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry* 2008; 69: 451-6.
- Nelson PL, Beck A, Cheng H. Transient receptor proteins illuminated: Current views on TRPs and disease. *Vet J* 2010.
- Nelson, E. K. The constitution of capsaicin—the pungent principle of capsicum I. *J Am Chem Soc* 1919; 41: 1115– 9.

- 
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 165-217.
- Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 396: 95–100.
- Pal M, Angaru S, Kodimuthali A, Dhingra N. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. *Curr Pharm Des* 2009; 15:1008-26.
- Patani GA, LaVoie EJ. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem Rev* 1996; 96: 3147-76.
- Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 55-68.
- Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, Zuidhof AJ. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain* 2003; 102: 297-307.
- Petersen CC, Berridge MJ, Borgese MF & Bennett DL (1995). Putative capacitative calcium entry channels: Expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J* 311, 41–44.
- Phillips AM, Bull A, Kelly LE. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 1992; 8:631- 42.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 387–93.
- Price TJ, Louria MD, Candelario-Soto D, Dussor GO, Jeske NA, Patwardhan AM, Diogenes A, Trott AA, Hargreaves KM, Flores CM. Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion. *BMC Neurosci* 2005;6:4.



- 
- Ramón Sánchez de Rojas V, Somoza B, Ortega T, Villar AM, Tejerina T. Vasodilatory effect in rat aorta of eriodictyol obtained from *Satureja obovata*. *Planta Med* 1999; 65: 234-8.
- Robbie EP, Peterson M, Amaya E, Musci TJ. Temporal regulation of the *Xenopus* FGF receptor in development: a translation inhibitory element in the 3' untranslated region. *Development* 1995; 121: 1775-85.
- Roede JR and Jones DP. Reactive Species and Mitochondrial Dysfunction: Mechanistic Significance of 4-Hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51:380-90
- Rossato MF, Velloso NA, de Oliveira Ferreira AP, de Mello CF, Ferreira J. Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. *J Pain* 2010; 11:545-54.
- Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002; Suppl:1062-7.
- Schumacher MA Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. *Pain Pract* 2010; 10: 185-200
- Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain and Nerves* 2008; 60: 157-170.
- Shieh KR, Yi CH, Liu TT, Tseng HL, Ho HC, Hsieh HT, Chen CL. Evidence for neurotrophic factors associating with TRPV1 gene expression in the inflamed human esophagus. *Neurogastroenterol Motil* 2010.
- Shimizu I, Iida T, Horiuchi N, Caterina MJ. 5-Iodoresiniferatoxin evokes hypothermia in mice and is a partial transient receptor potential vanilloid 1 agonist in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1378-85.
- Sokabe T, Tominaga M. Molecular mechanisms underlying thermosensation in mammals. *Brain Nerve* 2009; 61: 867-73.
- Stalmach A, Mullen W, Pecorari M, Serafini M, Crozier A. Bioavailability of C-Linked Dihydrochalcone and Flavanone Glucosides in Humans Following Ingestion of Unfermented and Fermented Rooibos Teas. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 7104–11.
- Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Environ Mol Mutagen* 2008; 1147: 37-52.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 2001; 29: 645-55.

- 
- Suh YG, Oh U. Activation and activators of TRPV1 and their pharmaceutical implication. *Curr Pharm Des* 2005; 11:2687–98.
- Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 383-94.
- Szabó A, Helyes Z, Sándor K, Bite A, Pintér E, Németh J, Bánvölgyi A, Bölcskei K, Elekes K, Szolcsányi J. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 111-9.
- Szallasi A, Blumberg PM. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 1989; 30: 515-20.
- Szallasi A, Blumberg PM. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* 1990; 524: 106-11.
- Szallasi A, Blumberg PM. Characterization of vanilloid receptors in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Res* 1991; 547: 335-8.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (). [<sup>3</sup>H]-resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn- Achmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 347: 84–91.
- Szallasi A, Conte B, Goso C, Blumberg PM, Manzini S. Vanilloid receptors in the urinary bladder: regional distribution, localization on sensory nerves, and species-related differences. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347: 624-9.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 159– 212.
- Szallasi A, Szabó T, Bíró T, Modarres S, Blumberg PM, Krause JE, Cortright DN, Appendino G. Resiniferatoxin-type phorboid vanilloids display capsaicin-like selectivity at native vanilloid receptors on rat DRG neurons and at the cloned vanilloid receptor VR1. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 428-34.
- Szebeni A, Jancsó-Gábor A, Wolleman M. Capsaicin receptor binding. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1978; 51-13.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A, JOO F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1975; 287: 157-69.

- 
- Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol Pain* 2010; 5: 6-15.
- Tai MH, Weng WT, Lo WC, Chan JY, Lin CJ, Lam HC, Tseng CJ. Role of nitric oxide in alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced hypotension in the nucleus tractus solitarius of the spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 455-61.
- Tan WJ, Xu JC, Li L, Chen KL. Bioactive compounds of inhibiting xanthine oxidase from *Selaginella labordei*. *Nat Prod Res* 2009; 23: 393-8.
- Thresh LT. Isolation of capsaicin. *Pharm J* 1846; 6: 941– 9.
- Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 2005; 451: 143-50.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.
- Varga A, Németh J, Szabó A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci Lett* 2005; 385: 137–42.
- Vlachová V, Teisinger J, Susánková K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklický L. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 2003; 23: 1340-50.
- aWalpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Perkins MN, Reid DJ, Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *J Med Chem* 1993; 36: 2362-72.
- bWalpole CS, Wrigglesworth R, Bevan S, Campbell EA, Dray A, James IF, Masdin KJ, Perkins MN, Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *J Med Chem* 1993; 36: 2373-80.
- Walker CI, Trevisan G, Rossato MF, Franciscato C, Pereira ME, Ferreira J, Manfron MP. Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. *J Ethnopharmacol* 2008; 120:169-75.
- Wang ZQ, Porreca F, Cuzzocrea S, Galen K, Lightfoot R, Masini E, Muscoli C, Mollace V, Ndengele M, Ischiropoulos H, Salvemini D. A newly identified role

- 
- for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 869-878.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9652-6.
- Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev* 2009; 60: 267-77.
- Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 1998; 273: 14085-9.
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* 2006; 2: 596-607.
- Yu L, Yang F, Luo H, Liu FY, Han JS, Xing GG, Wan Y. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol Pain* 2008; 4: 61
- Zhao H, Sprunger LK, Simasko SM. Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: 212-21.
- Zhu MX. Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch* 2005; 451: 105-15.