

## EMPREGO TERAPÊUTICO DA TETRODOTOXINA EM ORGANISMOS ANIMAIS

[*Therapeutic use of tetrodotoxin in animals*]

Andréia Piloto Gomes<sup>1</sup>, Amilton dos Santos<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Ambrósio<sup>3</sup>, Miriam Oliveira Ribeiro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bióloga, autônoma.

<sup>2</sup>Biólogo, pós-graduando da FMVZ da Universidade de São Paulo.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Doutor em Ciências – Professor livre-docente da FZEA da Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup>Bióloga, Doutora em Fisiologia – Professora adjunta do CCBS da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

**Resumo** - A Tetrodotoxina (TTX) é uma poderosa neurotoxina produzida por bactérias e é encontrada nos peixes da família Tetraodontidae, sendo estudada desde 1884. Essa toxina apresenta a capacidade de bloquear canais de sódio voltagem-dependentes graças a um grupo guanidina que se liga na abertura externa do canal. Graças a essa capacidade bloqueadora a Tetrodotoxina mostrou seu possível uso em novas terapias em diversas áreas. Os estudos compilados mostraram que a atividade farmacológica da TTX vem sendo extensivamente estudada e é visto seu emprego em terapias relacionadas a dores crônicas e neuropáticas, na diminuição da metástase em câncer, em terapias relacionadas a patologias nos sistemas muscular, esquelético e motor, além de seu uso nas terapias com sistema nervoso. Desta forma é possível concluir que essa toxina é promissora para novos tratamentos.

**Palavras-Chave:** Tetrodotoxina, baiacu, distrofia muscular de Duchenne.

**Abstract** - The Tetrodotoxin (TTX) is a powerful neurotoxin produced by bacteria and is found in a fish from Tetraodontidae family, which has been studied since 1884. This toxin has ability to block voltage-dependent sodium channels through guanidine group that binds to the outer opening of the channel. Thanks to this ability tetrodotoxin presents the possibility to be used as a new therapy in several areas. The studies showed that the pharmacological activity of TTX has been extensively studied and its use has been seen in therapy related to chronic pain and neuropathic, the reduction of metastasis in cancer, therapy related diseases in the muscular, skeletal, motor and nervous systems. This toxin has been showing as a promising tool to new treatments.

**Keywords:** Tetrodotoxin, ball fish, Duchenne muscular dystrophy.

### INTRODUÇÃO

As toxinas extraídas do meio ambiente, sendo de origem animal ou vegetal, vêm sendo utilizadas desde os tempos mais primórdios. Devido a acidentes e cultura de certos locais, o interesse por essas substâncias só tem aumentado. Com o avanço do homem em campos cada vez mais profundos da natureza, a ocorrência de acidentes com organismos tóxicos aumentou e tende a continuar crescendo e, desta forma, enquanto não haja uma conscientização antrópica sobre aspectos gerais da vida destes animais, os estudos não cessarão. Desta forma as pesquisas, principalmente na terapia só tendem a crescer.

### CLASSIFICAÇÃO DAS TOXINAS E COMO SÃO ENCONTRADAS NO AMBIENTE

As toxinas são, geralmente, substâncias produzidas por organismos vivos, sendo eles vegetais, animais, fungos ou bactérias. Além disso, é visto uma gama de variedade de formas moleculares. Essas toxinas são classificadas de acordo com seu estado físico, estrutura e estabilidade química, potencial intoxicante, além de seus mecanismos bioquímicos de ação (Klaassen, 2001).

No caso de toxinas animais há uma diferença significativa ao nos referirmos a animais tóxicos e a

animais venenosos. Os animais venenosos apresentam estruturas especializadas para sintetizar as próprias toxinas e, além disso, têm estruturas inoculadoras dos venenos. Por outro lado, os animais tóxicos não são capazes de sintetizar as toxinas, mas apresentam toxicidade em alguns tecidos ou no geral, porém podem ser produtos de metabólitos secundários ou adquiridos durante a cadeia alimentar. Desta forma, a intoxicação se dá, na maioria das vezes, pela ingestão do organismo tóxico (Klaassen & Watkins, 2001).

### HISTÓRICO DA TETRODOTOXINA

Os peixes da família Tetraodontidae são animais classificados como tóxicos por apresentarem a tetrodotoxina (TTX) (Narahashi, 2008; Rosker et al, 2007; Hagen et al, 2007), uma poderosa neurotoxina de baixo peso molecular que apresenta ação bloqueadora de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependente e foi isolada pela primeira vez em 1950 por Yokoo [fig. 1] (Nagushi & Arakawa, 2008; Goto et al, 1965), mas sua ação tóxica vem sendo estudada desde 1884 por Tahara (Suehiro, 1994). Em 1889 concluiu-se que o veneno do baiacu estava distribuído em alguns órgãos, como os ovários e fígado (Suehiro, 1994), mas hoje é sabido que a distribuição da toxina sofre variação entre as espécies, porém nas marinhas, o fígado e ovários são os mais acometidos, podendo ser encontrada, também, na pele e nos intestinos (Noguchi & Arakawa, 2008). Além disso, em estudos de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais para a TTX, Noguchi & Arakawa (2008) mostraram que, em algumas espécies, a toxina se encontra armazenada nos núcleos e na gema das vesículas e também nos grânulos dos oócitos. Portanto, a presença da tetrodotoxina nos ovos desses peixes pode ser interpretada como uma adaptação que confere proteção contra predadores (Noguchi & Arakawa, 2008).

Desde a descrição da tetrodotoxina muitos estudos revelaram a distribuição da toxina também em animais marinhos e terrestres (Pires et al, 2005) e hoje se sabe que é a toxina marinha mais potente nas intoxicações alimentares (Bragadeeswaran et al, 2010). Entretanto, apesar da maior ocorrência em tetraodontídeos, em 1964, Mosher et al identificou a TTX nos ovos da salamandra *Taricha torosa* (Noguchi & Arakawa, 2008), e após essa descoberta já foram relatadas outras espécies capazes de conter a tetrodotoxina como sapos, moluscos, platelmintos.

A TTX é produzida por uma bactéria marinha e, em peixes submetidos a uma dieta não-tóxica, ou seja,

sem a presença da bactéria produtora. Esses animais não apresentam toxicidade (Noguchi & Arakawa, 2008; Matsumoto et al, 2010).

Foram detectadas bactérias através de necropsias desses peixes e observaram que dois gêneros eram pertencentes à família *Listonella* (*Vibrio*) e mais duas do gênero *Alteromonas* e *Shewanella* (Klaassen & Watkins, 2001). Entretanto, outras três espécies foram isoladas do peixe *Arothron hispidus*, sendo elas *Kytococcus sedentarius*, *Cellulomonas fimi* e *Bacillus lentimorbus* (Bragadeeswaran et al, 2010).

Segundo Tortora et al (2005), as bactérias pertencentes à ordem Vibrionales são comumente encontradas em ambiente aquático, o que ajuda a explicar a presença desses gêneros na cadeia alimentar dos peixes dessa família. Entretanto, as demais espécies como a *Alteromonas tetraodonis* foi encontrada no ambiente marinho e apresenta uma produção de TTX na sua fase de crescimento, porém não na fase exponencial (Gallacher & Birkbeck, 1993). Ainda, outras duas espécies do gênero *Vibrio* e uma da espécie *Shewanella alga* foram testadas e foi detectada, na cultura, a toxina sobrenadante mesmo depois de entrar na fase estacionária (Gallacher & Birkbeck, 1993).

Desde a descoberta da ação bloqueadora de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependente, seu uso no estudo de canais de íons tem sido de grande valor (Rosker et al, 2007; Noguchi & Arakawa, 2008).

A intoxicação causada pelos peixes tetraodontídeos está relacionada, normalmente, pela tetrodotoxina, porém está presente nessas espécies outra neurotoxina designada como Saxitoxina. A tetrodotoxina é quimicamente diferente da saxitoxina, porém ambas causam os mesmos sintomas em mamíferos e se ligam nos mesmos receptores voltagem-dependente de Na<sup>+</sup>. A saxitoxina é encontrada na pele dos peixes, nas gônadas, no fígado, no músculo e vísceras (Landsberg et al, 2006), bem como a distribuição da tetrodotoxina em tetraodontídeos.

### FISIOPATOLOGIA

O envenenamento por tetraodontídeos é um tipo comum de intoxicação da região da Ásia e as mortes por intoxicação no Japão chegam a 50 por ano (Ahasan et al, 2004). Pequenas quantidades de tetrodotoxina podem causar uma morte rápida e violenta em animais e humanos (Bragadeeswaran et al, 2010) e os sintomas observados se iniciam com a paralisia da região oral, fraqueza dos membros inferiores seguido por paralisia de todo o corpo,

dores de cabeça, dificuldade para respirar, náusea e vômitos, visão turva e vertigens. A causa da morte está quase sempre relacionada com parada respiratória (Ahasan et al, 2004; Zimmer, 2010), embora, o coração seja um dos únicos órgãos que permanecem inalterados, mesmo em grandes concentrações da toxina (Zimmer, 2010).

## MECANISMOS DE AÇÃO

### Canais de Sódio Voltagem-dependentes e Ação Bloqueadora

Os canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes são proteínas de membrana heteroméricas, tendo uma subunidade principal,  $\alpha$ , que se dobra de tal maneira que forma poros seletivos de Na<sup>+</sup> através da membrana plasmática. A subunidade  $\alpha$  pode ser idealizada como sendo seis segmentos  $\alpha$ -hélices quatro vezes repetidas, sendo considerado um domínio cada grupo de seis. O caminho de passagem do íon é formado por uma porção entre as subunidades 5 e 6 e não possui uma forma elíptica, chamado de segmento P. A quarta subunidade contém vários grupos de aminoácidos polares que estão diretamente ligados ao canal sensível a voltagem, já os grupos contidos no segmento 6 são conhecidos pela metagênese que contribui, significativamente, a anestesia local ligadas a canais de Na<sup>+</sup> (Kyle & Ilyin, 2007; Lai et al, 2004). As subunidades  $\alpha$  estão em associação com uma ou duas das quatro subunidades  $\beta$  acessórias. Essas subunidades  $\beta$  auxiliares são estruturas transmembrânicas únicas com um largo domínio extracelular semelhante a uma imunoglobulina, também é essa subunidade responsável pela cinética e modulação da função do canal (Soong & Venkatesh, 2006).

As subunidades  $\alpha$  não são apenas subunidades formadoras de poros, mas também são sítios de ligação de toxinas antiepiléticas e anestésicas que se ligam para bloquear o canal. A tetrodotoxina e a saxitoxina e a  $\mu$ -conotoxina exemplificam as classes de toxinas que se ligam no sítio 1 da porção extracelular do canal e fecham o poro (Soong & Venkatesh, 2006).

A tetrodotoxina é uma toxina bloqueadora poderosa e específica para canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependente (Jang & Yotsu-Yamashita, 2006). Entretanto, essa ação bloqueadora de canais de Na<sup>+</sup> só é efetiva quando injetada externamente a célula (Narahashi, 2008). A toxina quando aplicada no interior celular não é capaz de obstruir esses canais graças ao um grupo guanidina apto a se ligar na abertura externa do canal (Narahashi, 2008). O mecanismo de ação

da TTX é diferente daquele empregado pelos anestésicos locais, uma vez que estas substâncias são eficientes bloqueadores de canais de Na<sup>+</sup> como também canais de K<sup>+</sup>, mesmo quando aplicados internamente na célula (Narahashi, 2008). Esses anestésicos entram na célula na forma neutra e no interior celular serão convertidas na forma catiônica.

### Sensibilidade dos Canais de Na<sup>+</sup> Voltagem-Dependentes a Tetrodotoxina

Nem todos os canais de sódio são sensíveis à ação bloqueadora da tetrodotoxina (Narahashi, 2008). Os canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes e as correntes que eles medeiam foram historicamente classificados em dois grupos em relação à sensibilidade a tetrodotoxina: Tetrodotoxina-resistentes, chamados de TTX-R e Tetrodotoxina-sensíveis, chamados de TTX-S (Kyle & Ilyin, 2007). As correntes observadas nos canais TTX-R são muito mais lentas do que as correntes dos canais TTX-S em função da sua cinética de ativação e de desativação (Narahashi, 2008) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Canais de sódio voltagem-dependentes em relação a sua sensibilidade, localização no cromossomo e gene.

Canal	Gene	Cromossomo	Sensibilidade
Nav 1.1	SCN1A	2q24	TTX-S
Nav 1.2	SCN2A	2q23-24	TTX-S
Nav 1.3	SCN3A	2q24	TTX-S
Nav 1.4	SCN4A	17q23-24	TTX-S
Nav 1.5	SCN5A	3p21	TTX-R
Nav 1.6	SCN8A	12q13	TTX-S
Nav 1.7	SCN9A	2q24	TTX-S
Nav 1.8	SCN10A	3p21-24	TTX-R
Nav 1.9	SCN11A	3p21-24	TTX-R
Nav	SCN6A/SCN7A	3p21-23	-

Neurônios aferentes primários nociceptivos contém quantidades significantivas de canais TTX-R que são classificados como canais Na<sub>v</sub> 1.8, Na<sub>v</sub> 1.9 e baixas quantidades de Na<sub>v</sub> 1.5. Por outro lado os canais Nav 1.1, Nav 1.4, Nav 1.6 e Nav 1.7 são sensíveis a concentrações nanomolares de tetrodotoxina (Kyle & Ilyin, 2007), ou seja, canais TTX-S. Assim, no cérebro é visto a expressão de canais do tipo Nav 1.1 a 1.3, Nav 1.5 e Nav 1.6 (Bhattacharya et al, 2009). Além disso, é visto o Nav 1.3 em nervos periféricos lesados, neurônios nociceptivos e em neurônios talâmicos, relacionados com as dores neuropáticas (Kayser et al, 2010), porém Jo et al (2004) observou em culturas de nervos periféricos normais e células neuroendócrinas

a presença de Nav 1.7 em altos níveis. Já nos músculos esqueléticos encontramos em maior quantidade o Nav 1.4, mas também foi encontrado o Nav 1.5 (Hirn et al, 2008), enquanto que no coração são vistos os canais Nav 1.5, Nav 1.7 em células musculares de aortas (Jo et al, 2004).

### ANÁLOGOS

A partir de metabólitos da síntese e degradação da toxina, análogos foram descobertos, sendo algum dos mais conhecidos o 6-epiTTX (Yasumoto et al, 1988), 11-norTTX-6(R)-ol isolado de tetraodontíformes (Endo et al., 1988), 11-norTTX-6(S)-o (Yotsu et al., 1992), 11-deoxyTTX (Yasumoto *et al.*, 1988), 5-deoxyTTX (Yotsu-Yamashita et al., 1999), o 5,6,11-trideoxyTTX, o 4-anhydroTTX, 5-deoxyTTX e o 4-ScysteinyITTX (4-CysTTX) são pouco tóxicos (Jang & Yotsu-Yamashita, 2006), como também o 1-hydroxy-5, 11-dideoxyTTX da salamandra *Taricha granulosa* e, o análogo isolado por Jang & Yotsu-Yamashita (2007) 6,11-DideoxyTTX. Outro análogo de tetrodotoxina encontrado é o 11-oxotetrodotoxina, entretanto é considerado raro, pois até agora foi detectado em apenas duas espécies marinhas, sendo um tetraodontíforme, *Arothrom nigropuctatus*, e um caranguejo *Atergatis floridus* e recentemente descoberto também em uma espécie de salamandra, *Notophthalmus viridescens*, sendo *Brachycephalus ephippium* o primeiro anuro a apresentar tal análogo (Pires et al, 2003). Este análogo difere, apenas, da tetrodotoxina por conter um grupo hidroximetil no carbono 6, sendo 4 – 5 vezes mais potente que a tetrodotoxina no bloqueio de canais de  $\text{Na}^+$  (Pires et al, 2003).

Uma vez vista essa capacidade de bloqueio de canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes, a tetrodotoxina tem mostrado um possível uso para novas terapias em diversas áreas. Desta forma, serão expostos alguns estudos com o intuito de mostrar a importância de aprimorar as pesquisas e aumentar o empenho de novas técnicas para o uso desta toxina em novas terapias.

### USOS TERAPÊUTICOS

A atividade farmacológica da tetrodotoxina vem sendo extensivamente estudada como um potencial agente terapêutico farmacológico (Bragadeeswaran et al, 2010). A primeira síntese de tetrodotoxina desenvolvida em laboratório foi feita por Kishi et al (*apud* Hinman & Du Bois, 2003) cerca de trinta anos atrás e uma rota mais recente feita por Isobe et al (*apud* Hinman & Du Bois, 2003). Em 2003 Hinman

& Du Bois com o uso de métodos mais modernos de catálise partindo de substâncias mais simples como uma amida sintetizada, a partir do ácido D-isoascórbico, sintetizou a tetrodotoxina.

A tetrodotoxina demonstrou ser efetiva em terapias com dores neuropáticas e crônicas. Assim, esta toxina está sendo utilizada em estudos clínicos com pacientes que apresentam dores relacionadas a diversas patologias (Bhattacharya et al, 2009). Além do tratamento da dor, essa toxina tem sido empregada na redução de metástase observada no câncer, sendo assim mais uma opção de tratamentos. Como essa toxina bloqueia canais de sódio voltagem-dependentes seu efeito tem sido estudado também em terapias para patologias que envolvem o sistema muscular e motor, tais como distrofia muscular de Duchenne, arritmia cardíaca e hipertensão arterial. Assim, é possível afirmar que a tetrodotoxina apresenta potencial terapêutico, trazendo menor risco a saúde dos pacientes, além de abrir novos horizontes para pesquisas.

### Terapias Relacionadas ao Sistema Muscular, Cardíaco e Motor

Os canais de sódio voltagem-dependentes estão presentes em uma gama muito variada de células excitáveis e, sendo assim, podem ser encontrados nas células musculares esqueléticas (Jo et al, 2004) assim como em células cardíacas (Zimmer, 2010).

Uma das alterações observadas no coração após sofrer um quadro de isquemia/hipóxia, é a existência de uma corrente elétrica contínua causada pela abertura de canais de sódio. Porém, esta corrente pode levar a arritmias e, portanto, à falência cardíaca. Assim, a tetrodotoxina se mostra eficaz quando aplicada nas células do miocárdio, trazendo uma normalização desses batimentos descontrolados. Além disso, a tetrodotoxina pode ser usada como agente hipotensor. Este efeito é causado por sua ação direta no sistema nervoso central (Zimmer, 2010), uma vez que é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica.

Em estudos realizados em modelos animais para Distrofia Muscular de Duchenne observou-se grandes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  nas fibras musculares esqueléticas. Além dessas alterações nas concentrações iônicas, ocorre também uma grande atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. No entanto, as causas para esse influxo excessivo de  $\text{Na}^+$  ainda são desconhecidas. Desta forma, aplicações de tetrodotoxina diminuíram significativamente o influxo de  $\text{Na}^+$ , evitando a morte celular. O canal Nav 1.4 pode ser a principal isoforma responsável

pelo influxo em células com distrofia (Hirn et al, 2008).

Dentre as doenças relacionadas aos sistemas muscular e motor a Distrofia Muscular de Duchenne tem um papel de destaque. Como demonstrado a tetrodotoxina atua na diminuição de perda de fibras musculares em ratos geneticamente modificados para esta doença e, este fato, pode trazer um aumento na sobrevida dos pacientes infectados, bem como uma melhora na qualidade de vida, já que a perda de fibras é o principal vetor para a morte do indivíduo. Já nas terapias relacionadas a sistema cardíaco, esta toxina obteve êxito como hipotensiva e reguladora dos batimentos cardíacos após um quadro de isquemia/hipóxia. Sendo assim, essa toxina se torna promissora para tratamentos de animais que apresentam tipos homólogos de Distrofia Muscular, como o caso da Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) e na Distrofia Muscular hipertrófica em felinos.

### Terapias Relacionadas ao Sistema Nervoso

Até o momento, a tetrodotoxina tem sido utilizada em terapias no sistema nervoso principalmente voltadas a lesões, sendo elas mecânicas ou inflamatórias. Lesões na medula espinhal são caracterizadas em duas fases sendo a primeira chamada de “injúria primária” que nada mais é que a lesão propriamente dita. A segunda fase, também chamada de “injúria secundária”, caracteriza-se por um grande número de traumas induzidos pelas mudanças fisiológicas e bioquímicas como, por exemplo, isquemia e anoxia, que ocorrem após horas e dias agravando o quadro do ferimento mecânico. Os déficits produzidos por injúrias na medula espinhal se dão, em grande parte, pela perda da matéria branca. O cálcio parece ter um papel importante nessa perda, pois injúrias causam um influxo de  $Ca^{2+}$  para o axônio, o que, se acredita, inicia uma série de eventos patológicos. Algumas evidências têm relatado que esse influxo de  $Ca^{2+}$  é mediado, em parte, pelo  $Na^+$  e, sendo assim, o bloqueio dos canais de  $Na^+$  preveniria, pelo menos em parte, as lesões causadas pelo influxo de  $Ca^{2+}$  (Rosenberg et al, 1999), em estudos de lesão da medula espinhal, analisou a ação da tetrodotoxina na prevenção da perda de matéria branca e concluiu que de fato, a administração local de tetrodotoxina *in vivo* diminuiu significativamente a perda de neurônios de grande diâmetro e também atenuou a patologia axoplasmática 4h e 24h após o ferimento (Rosenberg et al, 1999).

Em algumas doenças como a poliomielite, a síndrome da borne - poliomielite e a esclerose lateral

amiotrófica observa-se morte de motoneurônios e, portanto, diminuição da inervação e atividade de músculo esquelético. Assim ocorre um mecanismo de compensação dessa perda motora, que é o brotamento de ramificações axonais. Dessa forma, aumenta o número de fibras musculares inervadas pelo mesmo motoneurônio. Entretanto, a atividade neuromotora é diminuída em consequência do brotamento. Assim, o mecanismo compensatório acaba por enfraquecer os músculos. A tetrodotoxina foi testada no bloqueio deste processo de brotamento comprovou-se sua eficácia após a administração diária da toxina por longos períodos, ou seja, em tratamento crônico (Tam et al, 2002).

A lesão medular em animais é um fato comumente visto. Poucos dos casos dessas lesões são devido a doenças relacionadas aos discos intervertebrais, porém a maioria se dá por atropelamentos ou traumatismos. O avanço da lesão se dá da mesma maneira como vista em seres humanos, apresentando também a duas fases vistas (Webb et al, 2010).

Com relação ao sistema nervoso, os estudos apontam uma elevada importância da tetrodotoxina em terapias para evitar a perda de matéria branca e problemas decorrentes de doenças crônicas como a poliomielite e a esclerose lateral amiotrófica. Nesses casos, a toxina foi capaz de reduzir significativamente os respectivos sintomas, como visto nos trabalhos apresentados. Entretanto, em animais mais deve ser aprimorado para que seja feito seu uso, porém essa toxina já se mostra promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos.

### Terapias para o Câncer

Recentemente tem aumentado o interesse no uso da Tetrodotoxina nas terapias para o câncer. Entretanto, ainda pouco se sabe, mas já há relatos de eficácia nessas técnicas. O câncer é um dos principais motivos de morte por ano, podendo ser maior que problemas cardiovasculares, e a metástase é a maior causa dessa mortalidade (Onkal & Djamgoz, 2009). Porém, esse evento é considerado complexo.

Os canais iônicos são expressos em todas as células e alterações na sua expressão ou atividade pode estar envolvida em diversas patologias desde arritmias cardíacas, epilepsia, dores neuropáticas, entre outras (Onkal & Djamgoz, 2004).

Em células cancerosas metastáticas observa-se uma alteração da expressão de canais de sódio voltagem-dependente nas células e acredita-se que estes canais estejam intimamente ligados com o desenvolvimento

das metástases, por aumentarem sua agressividade (Bennet et al, 2004; Onkal & Djamgoz, 2009).

A insuficiência de Na<sup>+</sup> para as células cancerosas causa uma alteração na sua integridade, tendo como consequência supressão da invasão e da proliferação celular (Bragadeeswaran et al, 2010). Em estudos com câncer de próstata, Bennet et al (2004) observou que os canais de sódio voltagem-dependentes são necessários para a invasão tecidual.

Desta forma, a tetrodotoxina apresenta papel importante na supressão, *in vitro*, de células metastáticas de ratos em diferentes tipos de câncer. A toxina não apresenta efeitos em células não metastáticas uma vez que estas provavelmente não apresentam quantidades significativas de canais de sódio voltagem-dependentes funcionais quando comparadas a células com potencial de invasão (Onkal & Djamgoz, 2009).

Em animais, como cães e gatos, tipos de neoplasias de pele são frequentes como o histiocitoma, lipoma, adenoma, sarcoma, mastocitoma e linfossarcoma (Queiroz, 2004). Assim, com o intuito de prevenir e diminuir a metástase a tetrodotoxina poderia ser aplicada na substituição de tratamentos mais invasivos.

Em terapias relacionadas ao câncer, a tetrodotoxina atinge com maior intensidade as células metastáticas, sendo menos agressiva para as demais células do organismo, conforme mostrado. Desta forma, o tratamento com essa toxina se torna menos invasivo quando comparado a métodos tradicionais como a quimioterapia.

### Terapias para Dores Neuropáticas e Crônicas

As dores constituem uma complicação severa observada em diversas patologias e são consideradas sérios problemas clínicos. (Cummins et al, 2007). As dores neuropáticas são classificadas como “iniciadas ou causadas por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso” (Bridges et al, 2001) e seu tratamento constitui um grande desafio.

Drogas como anticonvulsivantes e antiepilépticos vêm sendo administradas para a melhora destas condições. Contudo, esses medicamentos não mostram tanta eficiência em sua duração bem como em sua ação, além de trazer outros problemas na qualidade de vida desses pacientes (Kayser et al, 2010).

Os canais de sódio voltagem-dependentes parecem estar intimamente ligados à geração de dores

neuropáticas (Lyu et al, 2000), uma vez que um dos mecanismos de sensações de dor é o aumento da excitabilidade de neurônios (Cummins et al, 2007). Acredita-se que os responsáveis por esses impulsos são os canais TTX-R por serem expressos nos pequenos neurônios (Lyu et al, 2000), ou seja, os de menor calibre (<30µm) (Baker & Wood, 2001) e transmitirem os potenciais da periferia para o Sistema Nervoso Central (SNC) (Cummins et al, 2007).

A tetrodotoxina vem sendo usada por neurocientistas por décadas para ajudar em diversos processos fisiológicos e patológicos do sistema nervoso, além de mostrar um importante papel no bloqueio da dor (Hagen et al, 2007). Esta toxina é uma das substâncias mais potentes no bloqueio de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes, além de apresentar uma ação reversível (Marcil et al, 2006). Porém, em estudos nos quais a toxina era aplicada na raiz do gânglio dorsal de ratos, mostrou-se que ela era capaz de diminuir a alodinia mecânica (Marcil et al, 2006) além de diminuir a dor em pacientes com câncer (Hagen et al, 2007). Sendo assim, a 2ª fase clínica foi implantada para evidenciar a atividade da toxina quando injetada por via intramuscular, e assim determinar a eficácia e a dosagem segura para a sua administração (Hagen et al, 2007).

A eficácia da Tetrodotoxina no bloqueio de dores inflamatória, neuropática e visceral, também foi demonstrada, porém o bloqueio de dores neuropáticas, no caso de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica se mostrou de maior relevância (Marcil et al, 2006). Isso mostra que o emprego de bloqueadores de Na<sup>+</sup> mesmo quando associados a outros medicamentos pode trazer uma nova linha de tratamentos com maior eficácia para dores de diversos tipos (Kaysen et al, 2010).

Nos estudos de Hagen et al, (2007), ficou evidente que o uso da toxina é tolerável, sendo que alguns dos pacientes responderam a doses mínimas de administração. Por outro lado, a tetrodotoxina obteve uma resposta mais eficiente em pacientes com dores somática e visceral, do que em dores neuropáticas (Hagen et al, 2007).

É visto um grande interesse e desenvolvimento de trabalho em torno dessa área de pesquisa da tetrodotoxina, possivelmente por apresentar melhores resultados do que as demais. Entretanto, muito ainda deve ser feito para que tenha uma comprovação efetiva de seus resultados e assim ser passível de uso em terapias com pacientes que apresentam dores neuropáticas ou crônicas.

A tetrodotoxina ao longo de quatro décadas mostrou-se eficiente no bloqueio de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes, sendo os principais responsáveis pela transmissão de potenciais de ação em neurônios nociceptivos. Por esta eficácia comprovada em trabalho, essa toxina encontra-se em fase clínica para pacientes com dores causadas pelo câncer. Desde o início dos estudos, até o que se tem visto atualmente, pode-se esperar que essa toxina traga muitos progressos para terapias de dor e uma melhora na sobrevivência desses pacientes.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diversos estudos vistos apontam que o uso da tetrodotoxina traz melhora em doenças relacionadas ao sistema motor, sistema nervoso, dores crônicas e neuropáticas, além do câncer. Por apresentar a capacidade de bloqueio de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes, a tetrodotoxina é capaz de ser empregada em uma gama de tratamentos de enfermidades relacionadas a esses canais.

Na medicina veterinária, essa toxina se mostra como mais uma opção de tratamento para doenças como Golden Retriever Muscular Dystrophy e Distrofia Muscular hipertrófica em felinos, lesões medulares traumáticas, câncer de pele, dores neuropáticas ou crônicas, sendo elas relacionadas ao câncer ou a traumatismos.

Desta forma, é possível concluir que essa toxina é vista como promissora para o desenvolvimento de tratamento menos agressivos, quanto diz respeito à dor. Por outro lado, os estudos não devem cessar, pois uma vez descoberta essa possibilidade de novos horizontes para terapias, muito mais pode ser aprimorado.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Isaac de Castro da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela grande ajuda na elaboração e ideia do trabalho.

### REFERÊNCIAS

Ahasan, H. A.; Mamun, A. A.; Karim, S. R.; Bakar, M. A.; Gazi, E. A.; Bala, C. S. 2004. Paralytic Complications of Puffer Fish (Tetrodotoxin) Poisoning. Singapore Med. J. 45(2): 73-74.

Baker, M. D. & Wood, J., N. 2001. Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. Trends in Pharmacological Sciences. 22(1): 27-31.

Bennet, E. S.; Smith, B. A.; Harper, J. M. 2004. Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. Eur. J. Physiol. 447: 908-14.

Bhattacharya, A.; Wickenden A. D.; Chaplan, S. R. 2009. Sodium Channel Blockers for the Treatment of Neuropathic Pain. Neurotherapeutics. 6(4): 663-678.

Bragadeeswaran, S.; Therasa D.; Prabhu, K.; Kathiresan K. 2010. Biomedical and pharmacological potential of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from marine pufferfish *Arothron hispidus* (Muller, 1841). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 16 (3): 421-31.

Brigdes, D.; Thompson, W. N.; Rice, A. S. C. 2001. Mechanisms of neuropathic pain. Br. J. Anaesth. 87(1): 12-26.

Cummins, T. R.; Sheets, P. L.; Waxman, S. G. 2007. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. Pain. 131: 243-57.

Endo, A.; Khora, S. S.; Murata, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T. 1988. Isolation of 11-nortetrodotoxin – 6(R) – ol and other tetrodotoxin derivatives from the puffer *Fugu niphobles*. Tetrahedron Letters. 29(33): 4127-28.

Gallacher, S. & Birkbeck, T. H. 1993. Effect of Phosphate Concentration on Production of Tetrodotoxin by *Alteromonas tetrodonis*. Appl. Env.Microb. 59(11): 3981-3983.

Goto, T.; Kishi, Y.; Takahashi, S.; Hirata, Y. 1965. Tetrodotoxin. Tetrahedron. 21: 2059-88.

Hagen, N. A.; Fisher, K. M.; Lapointe, B.; Du Souich, P.; Chary, S.; Moulin, D.; Sellers, E.; Ngoc, A. H. 2007. An Open-Label, Multi-Dose Efficacy and Safety Study of Intramuscular Tetrodotoxin in Patients with Severe Cancer-Related Pain. J. Pain Symptom Manage. 34(2): 171-182.

Hinman, A. & Du Bois, J. 2003. A stereoselective synthesis of (-)-Tetrodotoxin. J. Am. Chem. Soc. 125: 11510-11.

Hirn, C.; Shapovalov, G.; Peterman, O.; Roulet, E.; Ruegg, U. T. 2008. Na<sup>+</sup> v 1.4 Deregulation in Dystrophic Skeletal Muscle Leads to Na<sup>+</sup> Overload and Enhanced Cell Death. J. Gen. Physiol. 132(2): 199-08.

Jang, J. & Youtsu-Yamashita, M. 2007. 6,11-Dideoxytetrodotoxin from the puffer fish, *Fugu pardalis*. Toxicon. 50: 947-51.

Jang, J. & Yotsu-Yamashita, M. 2006. Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. Toxicon. 48: 980-87.

Jo, T.; Nagata, T.; Lida, H.; Imuta, H. Iwasawa, K. Ma, J.; Hara, K.; Omata, M.; Nagal, R.; Takizawa, H.; Nagase, T.; Nakajima, T. 2004. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: involvement of SCN9A. FEBS Lett. 567: 339-43.

Kayser, V.; Viguier, F.; Ioanni, M.; Bernard, J. F.; Latrémollière, A.; Michot, B.; Vela, J. M.; Buschamnn, H.; Hamno, M.; Bourgoin, S. 2010. Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic nerve- versus infraorbital nerve-ligated rats – behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations. Neuropharmacology. 58: 474-87.

Klassen, C. D. 2001. Casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons. 5<sup>a</sup> ed. Editora McGraw-Hill, Nova Iorque, p. 1110.

Klaassen, C. D. & Watkins III, J. B. 2001. Toxicologia: A ciência básica do tóxicos de Casarett & Doull's. 5<sup>a</sup> ed. Editora McGraw-Hill, Lisboa, p.864.

- Kyle, D. J. & Ilyin, V. I. 2007. Sodim Channel Blockers. J. Med. Chem. 50: 2583-88.
- Lai, J.; Porrega, F.; Hunter, J. C.; Gold, M. S. 2004. Voltage-Gated Sodium Channels and Hyperalgesia. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44: 371-97.
- Landsberg, J. H.; Hall, S.; Johannessen, J. N.; White, K. D.; Conrad, S. M.; Abbott, J. P.; Flewelling, L. J.; Richardson, R. W.; Dickey, R. W.; Jester, E. L.; Etheridge, S. M.; Deeds, J. R.; Van Dolah, F. M.; Leighfield, T. A.; Zou, Y.; Beaudry, C. G.; Benner, R.A.; Rogers, P. L.; Scott, P. S.; Kawabata, K.; Wolny, J. L.; Steidinger, K. A. 2006. Saxitoxin Puffer Fish Poisoning in the United States, with the First Report of Pyrodinium bahamense as the Putative Toxin Source. Environ. Health Perspect. 114: 1502-07.
- Lyu, Y. S.; Park, S. K.; Chung, K.; Chung, J. M. 2000. Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model. Brain Res. 871: 98-103.
- Marcil, J.; Walczak, J. S.; Guindon, J.; Ngoc, A. H.; Lu, S.; Beaulieu, P. 2006. Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents. Br. J. Anaesth. 96(6): 761-68.
- Matsumoto, T.; Tanuma, D.; Tsutsumi, K.; Jeon, J. K.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y. 2010. Plasma protein binding of tetrodotoxin in the marine puffer fish *Takifugu rubripes*. Toxicon. 55: 415-20.
- Nagushi, T. & Arakawa, O. 2008. Tetrodotoxin–Distribution and Accumulation in Aquatic Organisms, and Cases of Human Intoxication. Marine Drugs. 6: 220-42.
- Narahashi, T. 2008. Tetrodotoxin: a brief history. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 84(5): 147-54.
- Noguchi, T. & Arakawa, O. 2007. Distribution and Accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. Mar. Drugs. 6: 220-42.
- Onkal, R. & Djamgoz, M. B. A. 2009. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potencial of neonatal Nav 1.5 in brest cancer. Eur J Pharm. 625: 206-19.
- Pires, O. R. Jr.; Sebben, A.; Scharzt, E. F.; Morales, R. A.; Bloch, C. Jr.; Scharzt, C. A. 2005. Furter report of occurrenceof tetrodotoxin and new analogues in the Anuran family Brachycephalidae. Toxicon. 45: 73-79.
- Pires, O. R.; Sebben, A.; Schwartz, E. F.; Bloch, C.; Morales, R. A.; Scharzt, C. A. 2003. The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. Toxicon. 42: 563-66.
- Queiroz, G. F. 2004. Estudo clinico da eficácia da criocirurgia no tratamento de neoplasias de pele e/ou partes moles de cães e gatos. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 95p.
- Rosenberg L. J.; Teng, Y. D.; Wrathall, J. R. 1999. Effects of the sodium channel blocker Tetrodotoxin on acute White Matter Pathology after experimental contusive spinal cord injury. J. Neurosci. 19(14): 6122-33.
- Rosker, C.; Lohberger, B.; Hofer, D.; Steinecker, B.; Quasthoff, S.; Schreibmayer, W. 2007. The TTX metabolite 4,9-anhydro-TTX is a highly specific blocker of the Nav1.6 voltage-dependent sodium channel. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293: 783-89.
- Soong, T. W. & Venkatesh, B. 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals. Trends in Genetics. 22(11): 621-26.
- Suehiro, M. 1994. Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II. Yakushigaku Zasshi.. 29(3): 428-34.
- Tam, S. L.; Archibald, V.; Tyreman, N.; Gordon, T. 2002. Tetrodotoxin prevents motor unit enlargement after partial denervation in rat hindlimb muscles. J. Physiol. 543(2): 655-63.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. 2005. Microbiologia. 8 ed. Editora Artmed, Porto Alegre, p.
- Webb, A. A.; Ngans, S.; Fowler, J. D. 2010. Spinal Cord Injury I: A synopsis of the basic science. Can. Vet. J. 51 (5): 485-92.
- Yasumoto, T.; Yotsu, M.; Murata, M.; Naoki, H. 1988. New tetrodotoxin analogs from the newt *Cynops ensicauda*. J. Am. Chem. Soc. 110 (7): 2345-47.
- Yotsu, M.; Hayashi, Y.; Khora, S. S.; Sato, S.; Yasumoto, T. 1992. Isolation and structural assignment of 11-nortetrodotoxin-6-(S)-ol from the puffer *Arothron nigropunctatus*. Biosci. Biotech. Biochem. 56(2): 370-71.
- Yotsu-Yamashita, M.; Sshimmele, B.; Yasumoto, T. 1999. Isolation and structural assignment of 5-deoxytetrodotoxin from the puffer fish *Fugu poecilonotus*. Biosci., Biotech, Biochem.. 63(5): 961-63.
- Zimmer, T. 2010. Effects of Tetrodotoxin on the Mammalian Cardiovascular System. Mar. Drugs. 8: 741-62.